



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie - Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Laure BOBYK

le 10 novembre 2010

Renforcement de la dose par rayonnement synchrotron et atomes lourds dans le cadre du traitement des gliomes

Thèse dirigée par **Jean-Luc Ravanat** et codirigée par **Hélène Elleaume**

JURY

Dr Jean-Pierre POUGET - IRSN, INSERM, Montpellier	Rapporteur
Dr Cécile SICARD-ROSELLI - Université Paris Sud	Rapporteur
Pr Jacques BALOSSO - Université de Grenoble, CHU Grenoble	Président du jury
Pr Bruno CHAUFFERT - CHU Amiens	Examineur
Pr Serge PEREZ - European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble	Examineur
Pr Léon SANCHE - Université de Sherbrooke, Canada	Examineur
Dr Jean-Luc RAVANAT - CEA Grenoble	Examineur
Dr Hélène ELLEAUME - INSERM U836- Equipe 6, Grenoble	Examineur
Pr Jean LAISSUE - Université de Bern, Suisse	Invité

Thèse préparée au sein des laboratoires

Lésions des Acides Nucléiques – INAC SCIB UMR E3 CEA / UJF / CNRS FRE3200
Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives.

&

Rayonnement Synchrotron et Recherche Médicale
INSERM U836, Institut des Neurosciences, ESRF Grenoble.

dans l'Ecole Doctorale Chimie Sciences du Vivant

Remerciements

Voici la dernière page de ma thèse à écrire et pour moi c'est la plus agréable !!! Et oui, cette course folle de 3 ans, ne nous laisse pas toujours le temps de remercier les gens pour leur aide, conseil, ou soutien ou tout à la fois.

Je tiens, tout d'abord, à remercier Pascale Maldivi et Serge Pérez pour avoir soutenu mon dossier de financement de thèse et m'avoir permis de réaliser ma thèse ainsi que Thierry Douki et François Estève pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires/équipes respectifs. Merci Thierry pour ton aide lors des petits caprices de l'API3000, mais aussi d'avoir accepté que je parte pour Atlanta, ça a été très enrichissant pour moi. Merci François pour ton soutien lors des petits conflits, et de ton aide lors de manips, la nuit au synchrotron, avec des résultats pas toujours attendus !!

Je remercie également Cécile Sicard Roselli, Jean-Pierre Pouget, Jean Laissue, Bruno Chauffert, Léon Sanche, Serge Pérez et Jacques Balosso pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

J'ai eu la chance de travailler au sein de deux équipes et cette liste de remerciements en sera donc logiquement rallongée...

Si cette thèse a été si enrichissante pour moi, je le dois en très grande partie à Jean-Luc et Hélène, un duo parfait ! J'ai été le lien entre ces deux personnes, qui ont été pour moi des références, scientifiquement et humainement, et qui ont énormément contribué à la personne que je suis devenue aujourd'hui. Merci à tous les deux d'être si passionnés et si simples.

Jean-Luc, merci de m'avoir fait confiance dès mon arrivée en stage et de ton soutien pour dénicher un financement de thèse. Ton optimisme à toute épreuve m'a aidée à surmonter quelques moments de grande fatigue et d'expériences synchrotron assez éprouvantes!!! Merci également pour ta grande gentillesse, ta patience et ta compréhension.

Hélène, merci également pour ta confiance, et oui prendre en thèse une chimiste pour faire de la biologie et de la physique il fallait oser !!! Ta gentillesse, ta patience, ton soutien m'ont permis d'apprendre énormément dans beaucoup de domaines et de m'épanouir dans ce sujet.

Travailler à tes côtés a été un réel plaisir et nos discussions sur les manips à venir me manqueront....

Merci à tous les deux de m'avoir tant appris pendant ces 3 ans, d'avoir été si disponibles, d'avoir répondu à mes innombrables questions et ceci toujours dans un climat chaleureux. Merci à tous les deux d'avoir été si humains dans un monde qui semble l'être si peu parfois.

J'ai eu la chance de travailler sur un "grand instrument" : le synchrotron et si les expériences au synchrotron sont très intéressantes elles sont également assez épuisantes et je voudrais donc remercier toutes les personnes qui sont venues m'aider que ce soit le jour, la nuit, le week-end ou les vacances, pour quelques heures ou quelques jours...

Pierre a été un pilier pour toutes ces expériences et il a su m'accompagner dans des manips pas vraiment drôles. Pierre aime le salé et moi le sucré donc forcément on ne pouvait que s'entendre ! Merci Pierrot pour ton aide précieuse lors de toutes les manips et particulièrement aux heures que personne ne voulait, ta bonne humeur dans les moments qui ne me faisaient plus vraiment rire... Merci et bon courage !

Magali a également été d'un grand secours et nous avons partagé de nombreuses manips entre les murs du L2 pendant lesquelles nous comptons encore et toujours des cellules puis des colonies... Merci Mag pour ton aide pendant ces manips mais également pour toutes tes explications de physicienne qui m'ont bien souvent permis d'y voir plus clair dans tous ces photons et électrons. Merci aussi pour ton soutien lorsque que je n'étais plus si sûre d'y arriver et pour nos longues discussions, ça a été un vrai plaisir de partager tout ça avec toi, que de bons souvenirs...

Merci à **Mathias** d'avoir partagé le bureau 18.1.25 avec moi. Je ne mettrais pas de photos mais je me souviens très bien de tes yeux tout rouges après une nuit de comptage de cellules au microscope, merci pour ton aide pour les manips et aussi pour la gestion des caprices de mon ordinateur... Merci également de t'être frotté à nos petits ratatouilles, je sais que ça n'a pas été si évident pour toi.

Merci également à mon autre collègue de bureau, **Jeff**. Merci pour ton aide aussi bien au réglage du faisceau qu'à l'animalerie. Et merci pour les petites soirées d'après manip chez toi.

Remerciements

Je remercie aussi Dominique qui s'est si bien occupé de nos petits ratatouilles. Merci **Dom** pour ton grand professionnalisme et ta grande efficacité ainsi que tes petits conseils pratiques qui m'ont permis d'appréhender cette phase de ma thèse avec beaucoup de sérénité.

Mélanie a également été d'une grande aide, notamment avec des petits coups de pouce au quotidien qui ont simplifiés mon organisation. Elle a même été jusqu'à venir se frotter aux expériences synchrotron et je la remercie pour son aide très efficace. Merci **Mél** pour ton aide, nos longues discussions (téléphoniques ou non), tes conseils mais aussi nos petits gouters chocolatés pour recharger les batteries notamment en période de rédaction.

Christophe était le 3^{ème} thésard du trio. Merci **Christophe** pour nos longues conversations et ton soutien surtout pendant la rédaction merci beaucoup pour tes conseils, toi qui étais en avance de quelques semaines.

Côtoyer des chimistes, des biologistes, des physiciens, et des informaticiens au quotidien a été très enrichissant et je remercie l'ensemble des personnes du LAN, de l'équipe 6 et d'ID17.

Je remercie chaleureusement Didier, Serge, Walid, Sylvie, Jean pour tous les conseils dans leurs domaines respectifs ainsi que Zohra pour sa grande efficacité et Sylvain, Sandra, Joce, et Christine. Je remercie aussi les autres occupants du labo rose : Caro, Stéphane, Adeline, Coralie, Benoit, François et tous les autres pour les bons moments passés à la pause café : Anne, Viviana, Sarah, Guillaume, Ewa, Yves, Hassan, Mathilde...

Je remercie également les gens rencontrés sur ID17 et qui m'ont tous aidé à un moment ou un autre : Christian, Thierry, Charlène, Céline, Anne-Marie, Adeline, Sylvain, Muriel, Catherine et Julien.

Je remercie également Laurent Selek du GIN pour ses relectures, ainsi que Karin Pernet-Gallay et Julie Delaroche pour leurs analyses en microscopie et leurs explications dans ce domaine.

Lors des différents congrès, j'ai eu l'occasion de faire de sympathiques rencontres notamment avec Emilie, Yuliya et Julie. Merci à vous toutes pour ces bons moments.

C'est avec Julia que j'ai découvert ce sujet passionnant et qui m'a occupé pendant 3 ans.
Merci beaucoup **Julia** pour ton aide, tes conseils et nos longues discussions.

Je remercie enfin tous mes amis et ma famille pour leur soutien et leurs encouragements.
Mes parents ainsi que **Céline** et **Arnaud** sont un soutien inconditionnel et je les remercie du fond du cœur d'être toujours là pour moi.
Merci à ma petite princesse, **Sarah** d'être venue illuminer ma thèse.

A **Bibi**, ici je dirais juste : **MERCI** d'être là, pour tout et tout le temps.

ABREVIATIONS.....	1
AVANT PROPOS.....	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Gliome	5
II. Barrière Hémato-Encéphalique et injection intracérébrale	10
III. Traitement des gliomes de haut grade.....	15
IV. Dommages de l'ADN	22
V. Notions sur les rayonnements ionisants	45
VI. Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT).....	48
OBJECTIFS	53
TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	55
I. Techniques d'irradiation et d'imagerie	55
II. Evaluation de l'effet du rayonnement en présence ou non d'atomes lourds	64
CHAPITRE 1 ASSOCIATION D'AGENTS DE CHIMIOOTHERAPIE PLATINES ET DE RADIOTHERAPIE.	71
I. Chimio-radiothérapie des gliomes par le carboplatine	72
II. Quantification des adduits platinés de l'ADN et de l'ARN	77
III. Chlorure de chlorotertpyridineplatine, PtTC	83
CHAPITRE 2 AUGMENTATION DE DOSE PAR UNE IRRADIATION SYNCHROTRON EN PRESENCE D'AGENTS IODES	89
I. Contexte de l'étude	89
II. 5-iodo-2'-désoxyuridine, IUdR.....	90
III. IUdR et rayonnement	98
IV. Ioméron, agent de contraste	114
V. Association de l'IUdR et de l'ioméron	120
VI. Conclusion	121
CHAPITRE 3 PHOTOACTIVATION DE NANOPARTICULES D'OR DANS LE CADRE DE LA SSRT	127
I. Contexte de l'étude	127
II. Photoactivation des NPo <i>in vitro</i>	134
III. Photoactivation des NPo <i>in vivo</i>	143
IV. Conclusion	168
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
MATERIELS ET METHODES	177
I. Etudes cellulaires	177
II. Etudes sur les animaux	180
III. Lésions de l'ADN.....	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191
TABLES DES MATIERES	203

Abréviations

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ALA : acide 5-aminolévulinique
AP : apyrimidinic/apurinic (apyrimidique et apurinique, correspond aux sites abasiques)
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
BCNU : bis-chloronitrosourea
BER : base excision repair (réparation par excision de base)
BET : bromure d'éthidium
BHE : barrière hémato-encéphalique
BNCT : boron neutron capture therapy
BrdU : 5-bromo-2'-désoxyuridine
C : cytosine
CED : convection enhanced delivery
cisPt : cisplatine
CTRx : computed tomography radiotherapy X
Da : dalton
DBS : double strand break (cassure double-brins)
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DMSO : diméthyl sulfoxyde
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
EHNA: érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine
ESRF : European Synchrotron Research Facility
eV: électronVolt
FA : formiate d'ammonium
FDA : Food and Drug Administration
G : guanine
HCl : acide chlorhydrique
HPLC : high performance liquid chromatography
i.c. : intracarotidien
ICP-MS : inductively coupled plasma- mass spectrometry
IRM : imagerie par résonance magnétique

IMRT : intensity modulated radiation therapy

IUdR : 5-iodo-2'-désoxyuridine

i.v. : intraveineux

LMDS : locally multiple damaged sites (dommages multiples localisés)

MDR : multi drug resistance (résistance multi drogue)

MGMT : O6-méthyl-guanine-DNA méthyltransférase

MRP : multidrug resistance-associated protein

MS : mass spectrometry

NanoSIMS : nanoscale secondary-ion mass spectrometry

NHEJ : non-homologous end-joining (religation non homologue)

NER : nucleotide excision repair (réparation par excision de nucléotide)

NIST : National Institute of Standards and Technology

NPo : nanoparticules d'or

OMS (WHO) : Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization)

o.p : osmotic pump

PBS : phosphate buffered saline

PEG : polyéthylène glycol

PKC : protéine kinase C

Ppi : pour préparation injectable

PS : pénicilline-streptomycine

PTFE : polytétrafluoroéthylène

PtTC : chlorure de chlorotertpyridineplatine

ROS : reactive oxygen species (espèce réactive de l'oxygène)

SDS : sodium dodecyl sulfate (laurylsulfate de sodium)

SER : sensitization enhanced ratio (facteur d'augmentation de la sensibilité)

SSB : single strand break (cassure simple-brin)

SVF : sérum de veau fœtal

T : thymine

TEA : acétate de triéthylammonium

TEL : transfert d'énergie linéique

U : uracile

Avant propos

Le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde, il représente d'après l'OMS environ 13 % de la mortalité mondiale. Le cancer se définit comme une tumeur maligne caractérisée par une prolifération anarchique des cellules ou d'un tissu concernant l'ensemble des organes. Si le développement des thérapies anticancéreuses a permis l'amélioration des traitements d'une partie considérable des cancers, certaines formes de tumeurs demeurent encore d'un pronostic très pessimiste. En effet, si l'incidence des tumeurs cérébrales primitives n'est pas très élevée, de l'ordre de 10 à 15 cas / 100 000 personnes / an, ces tumeurs et plus particulièrement les gliomes de haut grade ont un pourcentage de survie à 5 ans de 2%.

Le cerveau est l'organe le plus complexe et le plus fragile de l'organisme. Son confinement dans la boîte crânienne engendre inévitablement une compression lors du développement du volume tumoral. Si une partie de ces tumeurs cérébrales peut être guérie par une résection chirurgicale, l'aspect très invasif et diffus des gliomes de haut grade rend cette solution insuffisante. Comme pour beaucoup de tumeurs la radiothérapie est proposée, mais la sensibilité des tissus sains cérébraux limite son efficacité. Le développement de la chimiothérapie est quant à lui confronté à la présence de la barrière hémato-encéphalique qui isole la structure fragile, qu'est le cerveau, du reste de l'organisme. Le traitement des gliomes de haut grade reste donc un défi thérapeutique, puisque les traitements disponibles actuellement ne sont que d'ordre palliatif.

Cette pathologie requiert l'attention de nombreuses équipes de recherches, et allie différents domaines scientifiques : de façon évidente la biologie et la médecine, mais aussi la chimie, la physique ou bien encore l'informatique. Toutes ces équipes interviennent à différentes étapes de la maladie : bien en amont, avec des études fondamentales sur la compréhension des mécanismes de la genèse des tumeurs, juste avant avec les études abordant sa détection, au cœur du sujet avec l'étude de l'évolution, de la propagation et des traitements de la maladie et enfin en aval avec des études épidémiologiques.

La thérapie proposée pour les gliomes de haut grade dans ce travail concerne le développement de la radiothérapie avec un renforcement de la dose par la présence d'atomes lourds au sein de la zone tumorale. Des études cellulaires ainsi que des essais précliniques ont été réalisés avec pour objectif de mieux appréhender les mécanismes biologiques induits par l'irradiation mais aussi de développer un traitement efficace des gliomes de haut grade.

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques » du CEA de Grenoble et dans l'équipe « Recherche Médicale et Rayonnement Synchrotron » de l'INSERM U836 ainsi qu'à l'ESRF de Grenoble. La collaboration entre le laboratoire des Lésions des Acides Nucléique, dont les sujets de recherche très variés convergent tous vers les dommages de l'ADN et l'équipe 6 de l'Institut des Neurosciences, dont le thème de recherche principal est le renforcement de la dose par photoactivation, m'a permis d'évoluer au sein d'équipes de domaines d'expertises différents et ainsi d'aborder cette thématique avec une vision pluridisciplinaire du sujet.

L'introduction de cette thèse abordera des thématiques variées, telles que la description des gliomes (de leur formation jusqu'aux traitements proposés), la place de l'ADN dans les thérapies anticancéreuses et enfin la genèse et l'évolution de la thérapie par photoactivation.

Etude bibliographique

I. Gliome

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primitives¹ dont l'incidence en France est de 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. La médiane de survie des patients atteints de gliome de haut grade est en moyenne de 14 mois après le diagnostique et entre 9 à 12 mois pour les glioblastomes.

Les facteurs de risque sont peu connus, le seul facteur de risque environnemental qui soit établi est l'exposition à de fortes doses d'irradiation ionisante.

I.A. Cellules gliales

Ce qui définit un neurone c'est sa capacité à transmettre rapidement un signal électrique sous la forme de potentiel d'action. Toute autre cellule du système nerveux central est classée sous le terme de glie. Le cerveau humain est constitué d'environ 10 % de neurones et 90 % de cellules gliales (Allen and Barres, 2009).

Les cellules gliales régissent de nombreuses fonctions centrées sur le bon fonctionnement des neurones. Elles assurent, en effet, l'isolement physique et électrique de ceux-ci, ainsi que les fonctions métaboliques, le soutien squelettique et leur protection contre les corps étrangers. L'homéostasie du milieu neuronal est également pris en charge par la glie puisqu'elle forme la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Les cellules gliales se classifient en deux parties, la microglie et la macroglie, elle-même composée d'astrocytes, d'oligodendrocytes et d'épendymocytes.

La microglie : ces cellules interviennent au niveau du système immunitaire. En effet, ce sont des macrophages résidents cérébraux, qui phagocytent les débris cellulaires lors des phénomènes d'apoptose. La microglie est la principale défense du système nerveux central.

- **La macroglie**

Les astrocytes ont une forme étoilée et assurent plusieurs fonctions telles que le soutien squelettique et l'isolement physique des neurones. Les astrocytes de type I forment en partie la BHE. Ils sont le lien entre les capillaires sanguins et les neurones et jouent un rôle

¹ Tumeur cérébrale primitive : qui s'est développée à partir de cellules du cerveau, en opposition aux métastases.

important dans le métabolisme et l'approvisionnement en nutriment des neurones. Les astrocytes de types II entourent le neurone et la fente synaptique et garantissent ainsi la bonne transmission du message nerveux. Ils contrôlent aussi les concentrations ioniques et en neurotransmetteurs de la fente synaptique.

Les oligodendrocytes sont à l'origine des gaines de myéline (membrane riche en lipides) qui entourent les axones des fibres nerveuses et sont indispensables à une conduction rapide du message nerveux. Un oligodendrocyte peut fournir une gaine de myéline à plusieurs axones de fibres nerveuses (jusqu'à 50).

Les épendymocytes forment la paroi des ventricules cérébraux et du canal de l'épendyme. Ces cellules sont aussi responsables de la synthèse du liquide céphalo-rachidien (Doetsch, 2003).

La compréhension du rôle des cellules gliales est en pleine expansion et des récents travaux tendent à montrer que ces cellules participent à la dynamique de la transmission et aux traitements des informations dans le système nerveux. Les astrocytes notamment ont longtemps été considérés comme des cellules ne générant pas de potentiel d'action ni de myéline mais nettoyant l'espace extracellulaire et fournissant les substrats nécessaires aux fonctions neuronales. Or des données récentes montrent que ces cellules sont plus des participants actifs de l'activité cérébrale que des éléments passifs entretenant l'espace extracellulaire. En effet, actuellement il est connu que les astrocytes participent à plusieurs fonctions cruciales telles que la formation des synapses, la survie neuronale, la régulation de l'angiogénèse² et le maintien d'un environnement stable, mais les mécanismes de ces fonctions restent encore à élucider (Wang and Bordey, 2008).

² Angiogénèse : croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants.

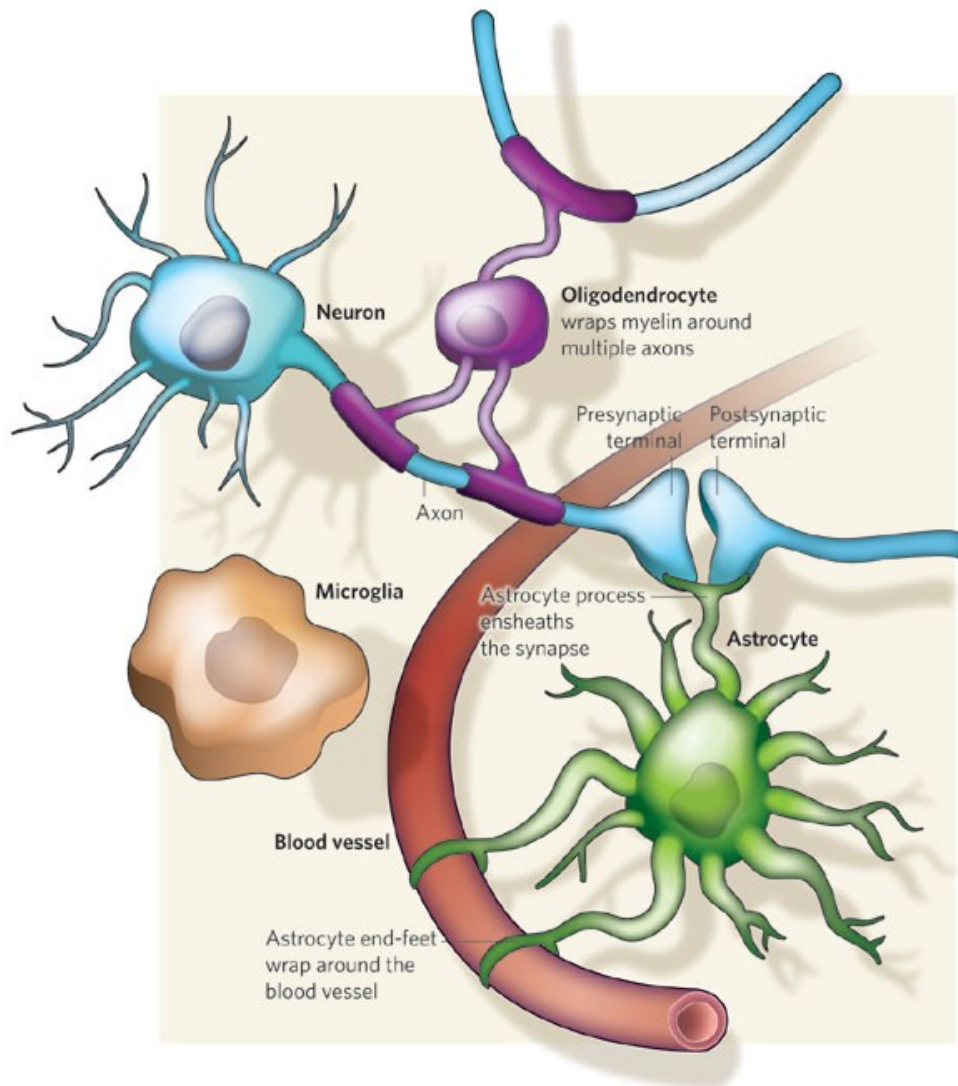


Figure 1 : Interactions Glie-Neurones, les différents types cellulaires de la glie interagissent avec les neurones et les vaisseaux sanguins environnants. Les oligodendrocytes enveloppent de myéline les axones pour accélérer la transmission neuronale. Les astrocytes entourent les vaisseaux sanguins et les synapses. La microglie protège le cerveau des dommages et infections (Allen and Barres, 2009).

I.B. Gliomes

Les gliomes font parti des tumeurs cérébrales primitives qui représentent 20% des tumeurs chez l'enfant et 2% des tumeurs chez l'adulte. Le gliome est la tumeur cérébrale la plus fréquente puisqu'il représente 30 % de l'ensemble des tumeurs cérébrales primitives. Ces tumeurs histologiquement hétérogènes et invasives dérivent de la glie décrites ci-dessus et peuvent se développer dans n'importe quelles parties du cerveau. La classification la plus répandue est celle de l'OMS qui est basée sur des critères histologiques (type cellulaire) et sur la définition de grade.

- Astrocytomes avec comme sous catégorie :
 - astrocytome pilocytique grade I
 - astrocytome diffus, grade II
 - astrocytome anaplasique, grade III
- Oligodendrogliomes
 - oligodendrogliome, grade II
 - oligodendrogliome anaplasique, grade III
- Tumeurs mixtes
 - Oligoastrocytome, grade II
 - Oligoastrocytome anaplasique, grade III
 - Glioblastome à composante oligodendrogliale, grade IV
- Glioblastomes, grade IV

Ces différents gliomes sont classés en 4 grades, du plus bénin (grade I) au plus malin (grade IV). Les seuls gliomes de grade I, dit bénins sont les astrocytomes pilocytiques. Ils peuvent être guéris si la tumeur est accessible à la chirurgie car ces tumeurs ont une limite nette avec le parenchyme normal, à l'inverse de tous les autres gliomes dont une des caractéristiques majeures est leur aspect infiltratif. Les gliomes de grade II sont des gliomes à devenir malin car ils évoluent lentement mais quasiment de façon inéluctable vers des gliomes de haut grade (III ou IV). L'évolution se fait en général sur plusieurs années. Dès ce grade, les gliomes sont très infiltrants et la chirurgie aussi maximaliste puisse-t-elle être ne peut permettre leur exérèse complète. Elle contribue par contre à retarder leur évolution et augmenter la durée de survie. Les gliomes de grade III et IV, sont communément appelés gliomes de haut grade ou gliomes malins. Les gliomes de grade III sont issus de l'évolution d'un gliome de bas grade, leur degré d'anaplasie³ et de prolifération sont plus importants. Enfin, les gliomes de grade IV correspondant aux glioblastomes multiformes (GBM) peuvent survenir *de novo* ou être le résultat d'une évolution d'un gliome de bas grade (dits GBM secondaires), ils sont notamment caractérisés par une forte prolifération et la présence de tissus nécrotiques. Les glioblastomes représentent 60 à 70% des gliomes et se localisent dans

³ Perte des caractères morphologiques et fonctionnels des cellules du tissu originel.

les hémisphères cérébraux. Les glioblastomes *de novo* sont beaucoup plus fréquents que ceux issus de l'évolution de gliomes de grade II ou III et surviennent chez des sujets plus jeunes. Malgré un aspect histologique et un pronostic très similaire les glioblastomes *de novo* et les glioblastomes secondaires ont des caractéristiques génomiques très différentes (Ducray, 2008). Les principales voies d'oncogenèse représentées ci-dessous reflètent également les différences entre ces deux glioblastomes. En effet, comme pour tous les cancers, des mutations génétiques sont présentes dans les tumeurs. Sur la Figure 2 sont représentées celles relatives aux gliomes. La mutation p53 apparaît relativement tôt dans le développement des astrocytomes, alors que la perte ou mutation de PTEN (Phosphatase et TENsin homolog⁴) et l'amplification de EGFR (récepteur des facteurs de croissance épidermique) sont caractéristiques des tumeurs de plus haut grade. La perte des chromosomes 1p et 19q dans le cas des oligodendrogliomes sera abordée plus tard.

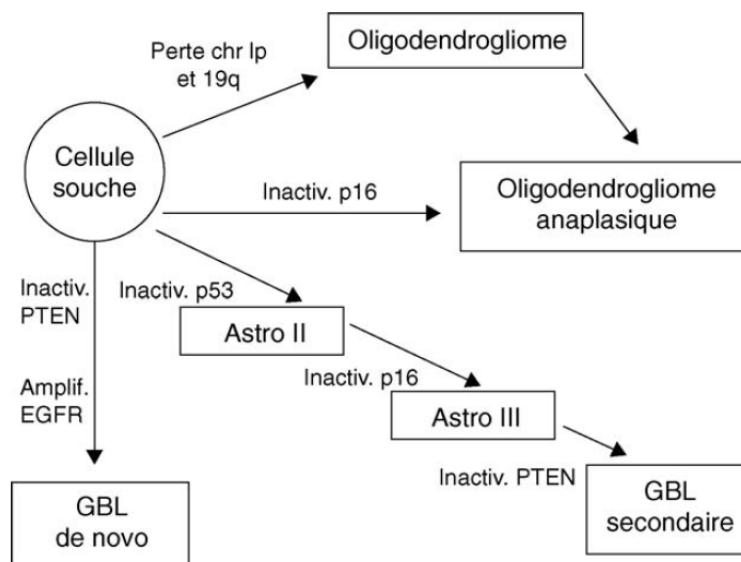


Figure 2 : Schéma simplifié des grandes voies de l'oncogénèse de tumeurs gliales de haut grade, GBL : glioblastome (Chatel, 2005).

Ces différences moléculaires au sein d'un même groupe sont, entre autres, à la base des critiques portant sur cette classification. Cette classification est en effet loin de faire l'unanimité au sein de la communauté scientifique. L'observation de sous-catégories de patients répondant plus ou moins aux traitements et ayant des tumeurs différentes au regard de leurs altérations génomiques et/ou protéomiques contribue aux débats. Il apparaît comme assez important de compléter la classification existante par une classification basée sur une

⁴ Gène suppresseur de tumeur, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire.

identification biomoléculaire, afin de former des groupes plus homogènes en termes d'entités moléculaires et donc en termes de pronostic. Tout le travail reste à faire puisqu'il faut encore identifier (même si certains sont déjà connus) et déterminer quelles combinaisons de marqueurs moléculaires pourraient être utilisées afin de compléter la classification histologique.

Une des difficultés évidentes dans le traitement des gliomes est leur localisation particulière. Le cerveau est un organe sensible, d'une organisation aussi complexe que fragile et une tumeur cérébrale même bénigne, de par son volume et le caractère indéformable de la boîte crânienne, peut comprimer certaines régions du cerveau et induire d'importants dommages selon la zone concernée.

D'autre part, la présence de la barrière hémato-encéphalique constitue un problème majeur rencontré pour l'efficacité des agents de chimiothérapie dans le traitement de ces tumeurs.

II. Barrière Hémato-Encéphalique et injection intracérébrale

II.A. Barrière Hémato-Encéphalique

La signalisation neuronale dans le système nerveux central requiert un microenvironnement hautement fiable. Ce microenvironnement est préservé grâce à la présence d'un système dynamique : la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui est formée de cellules endothéliales qui tapissent les microvaisseaux cérébraux. Cette barrière est la plus vaste aire d'échange entre le sang et le cerveau, chez un adulte cette surface d'échange est estimée en moyenne entre 12 et 18 m² (Abbott *et al.*, 2010).

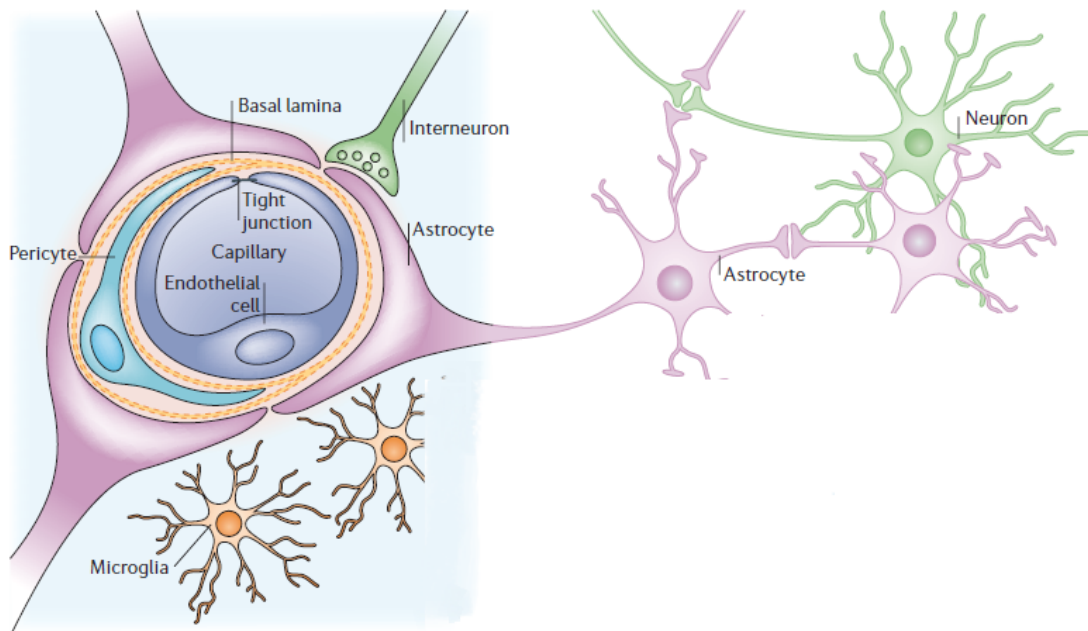


Figure 3 : Constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique. La barrière est formée par des cellules endothéliales capillaires, entourées de lame basale et de pieds astrocytaires périvasculaires. Les astrocytes constituent le lien cellulaire avec les neurones. La figure montre aussi des péricytes et des cellules microgliales (Abbott *et al.*, 2006).

La BHE agit comme une **barrière physique** grâce aux jonctions étroites entre les cellules endothéliales adjacentes. Des petites molécules gazeuses comme le dioxygène et le dioxyde de carbone peuvent diffuser librement à travers les membranes lipidiques, c'est aussi une voie d'entrée pour les petites molécules (moins de 180 Da) lipophiles comme les drogues telles que les barbituriques et l'éthanol. Des systèmes de transport spécifiques régulent les échanges des petites molécules hydrophiles permettant ou facilitant l'entrée des nutriments indispensables et excluant les composés potentiellement nocifs. Une activité importante des pompes d'efflux offre encore une protection supplémentaire en expulsant les composés nocifs vers le sang. Enfin, une combinaison d'enzymes intra et extra cellulaires constitue une **barrière métabolique**, en métabolisant les peptides et l'ATP et en rendant inactifs des composés neuroactifs et toxiques. L'endothélium cérébral a une plus faible activité d'endocytose que l'endothélium périphérique ce qui rend la pénétration des grosses molécules hydrophiles très restreinte. La BHE ne fournit pas seulement un environnement stable au système nerveux central, mais par la combinaison de canaux ioniques et de transporteurs elle assure aussi une composition ionique optimale pour la fonction de signalisation synaptique (Abbott *et al.*, 2010). Toutes ces fonctions de la BHE sont essentielles à un bon fonctionnement du système neuronal et à sa protection, mais elles constituent une difficulté

conséquente pour la pénétration, après injection systémique, des agents de chimiothérapie vers leurs cibles.

II.B. Injection intracérébrale

Pour l'utilisation d'agents de chimiothérapie, à l'exception de quelques composés présentés plus loin, qui sont lipophiles et qui peuvent traverser la BHE, le premier obstacle rencontré est celui de la BHE qui limite l'accès de nombreuses drogues au cerveau. Pour contourner ce problème, différentes méthodes peuvent être envisagées.

II.B.1 Perméabilisation de la BHE

En 1972, Rapoport et ses collaborateurs rapportent qu'après l'injection d'une solution hypertonique (mannitol) la perméabilité de la BHE est augmentée. Il propose comme mécanisme la perturbation des jonctions étroites inter-endothéliales (Rapoport, 2000). Ceci est ensuite confirmé par l'équipe de Brightman qui a pu visualiser l'ouverture des jonctions endothéliales au microscope électronique après injection intracarotidienne de mannitol (Bellavance *et al.*, 2008). Bien que le mécanisme exact soit encore source de discussion, ces travaux ont permis d'obtenir un moyen de perméabiliser physiquement la BHE. Cette technique qui permet une meilleure libération de la drogue au sein du cerveau a été testée lors d'essais précliniques et a même donné des résultats encourageants lors d'essais cliniques sur des patients porteurs d'astrocytomes malins traités par une combinaison de carboplatine, étoposide et perméabilisation de la BHE (Bellavance *et al.*, 2008). Cette approche nécessitant une anesthésie générale et le placement d'un cathéter intra-artériel est classifiée dans les approches chirurgicales du contournement de la BHE.

Deux autres approches sont considérées comme des approches chirurgicales de par leur aspect invasif, il s'agit des implants intracérébraux et du mode d'injection intracérébrale par convection (appelé couramment Convection Enhanced Delivery, CED). Ces méthodes d'injection de la chimiothérapie permettent un accès direct des composés actifs au site tumoral. Ces méthodes sont couramment nommées la chimiothérapie interstitielle.

II.B.2 Implants biodégradables

Une des solutions au problème posé par la présence de la BHE est de profiter de l'accès direct au site tumoral lors de la résection de celle-ci pour y déposer des implants libérant l'agent actif. Des composés actifs ont été développés sous forme de polymères

biodégradables qui vont permettre une diffusion plus ou moins lente du composé directement dans la cavité chirurgicale. Pour exemple, la carmustine qui est un agent de chimiothérapie, a été développée sous forme d'implants biodégradables (Gliadel) qui sont implantés dans la cavité chirurgicale créée suite à l'exérèse de la tumeur et qui une fois en place se dissolvent lentement (Perry *et al.*, 2007). Ceci permet la libération de l'agent pendant quelques jours directement sur le site tumoral en concentrations élevées, tout en réduisant la toxicité systémique (Arifin *et al.*, 2009). Les résultats de ces travaux seront développés plus loin.

II.B.3 Injection intracérébrale par convection (CED)

Une autre voie de chimiothérapie interstitielle est celle de l'injection intracérébrale par convection. Ceci consiste en une injection dont le débit est contrôlé par une pompe. La seringue est placée sur une pompe qui va permettre de délivrer le composé avec un débit d'injection continu et reproductible. L'agent est donc délivré par convection et non par diffusion, ce qui permet d'obtenir des concentrations élevées de drogues dans des grands volumes tissulaires, à l'inverse de l'administration par diffusion qui induit une décroissance exponentielle de la concentration en agent depuis le point d'injection (Figure 4). La diffusion est faible et lente dans les tumeurs et le tissu interstitiel cérébral, la CED permet donc de distribuer dans le cerveau des composés de tout poids moléculaire, en s'affranchissant des limitations de la diffusion.

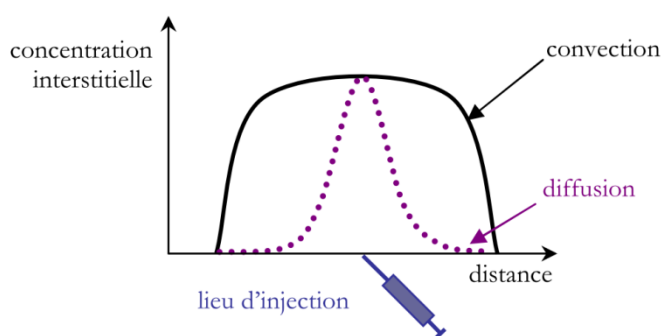


Figure 4 : Schéma des profils de concentrations obtenus après administration d'une drogue par convection ou par diffusion (Raghavan *et al.*, 2006).

L'efficacité de cette voie d'injection a été évaluée sur l'homme lors d'essais précliniques, principalement pour le traitement de pathologie cérébrale (Voges *et al.*, 2003). C'est également une voie d'accès potentielle au tronc cérébral, qui est une structure difficilement accessible (Song and Lonser, 2008).

II.B.4 Pompe osmotique

Une autre méthode d'injection intracérébrale envisageable est l'utilisation d'une pompe osmotique, qui permet une diffusion lente et continue des composés. Son fonctionnement est basé sur le principe de la pression osmotique. Le dispositif comporte 4 parties : le corps de la pompe, le modérateur de flux, le tube cathéter et la canule d'injection cérébrale. Le corps de la pompe est constitué d'une membrane interne imperméable et déformable contenant l'agent, d'une membrane extérieure semi-perméable et indéformable et entre ces deux membranes d'une couche d'eau salée, nommée couche osmotique (Figure 5). Lorsque que le corps de la pompe est introduit sous la peau de l'animal, un gradient de pression osmotique se crée entre le compartiment osmotique de la pompe et les tissus. Pour atteindre l'équilibre entre ces pressions, de l'eau provenant des tissus pénètre dans la couche osmotique ce qui déforme la membrane interne et induit l'évacuation de l'agent par le modérateur de flux. Ainsi le débit de la pompe est uniquement contrôlé par la perméabilité de la membrane externe et reste indépendant de la nature de la drogue.

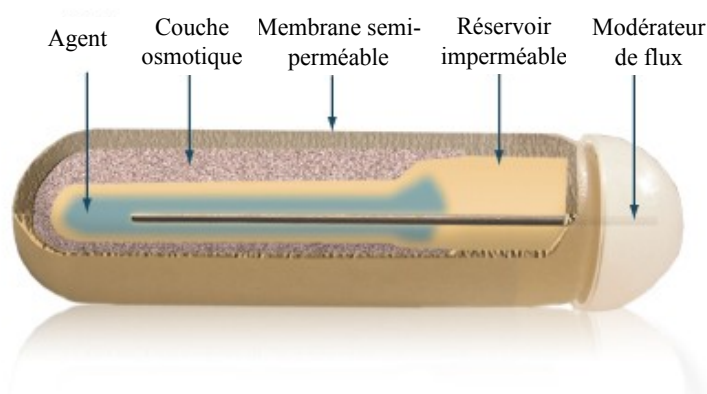


Figure 5 : Descriptif d'une pompe osmotique (www.alzet.com).

Le corps de la pompe est donc placé en sous cutané dans le dos de l'animal, tandis que le tube cathéter reliant la pompe à la canule se situe le long du cou de l'animal et la canule est finalement collée sur son crâne (Figure 6).

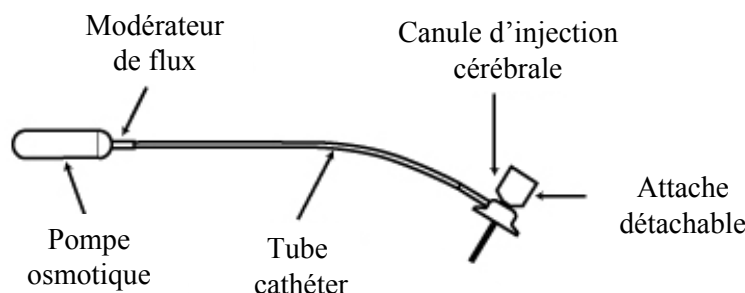


Figure 6 : Différents éléments du système pompe osmotique - kit d'infusion cérébrale (www.alzet.com).

Ce dispositif n'a actuellement pas d'autorisation pour une utilisation chez l'homme.

Par ces différentes voies d'injection intracérébrale, la BHE est évitée ce qui permet de réduire la toxicité systémique en réduisant la concentration sérique⁵ de l'agent thérapeutique. Une injection continue est également possible par ces méthodes d'injection. Enfin la contrainte majeure à l'utilisation de ces moyens d'injection est leur aspect invasif.

III. Traitement des gliomes de haut grade

Les traitements disponibles sont de plusieurs natures : chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie sont bien souvent combinés. Les traitements sont dépendants du type de gliome, nous ne développerons que ceux concernant les gliomes de haut grade (grade III et IV). Actuellement, la thérapie proposée en réponse aux glioblastomes débute par l'exérèse de la tumeur, si la position de celle-ci le permet. Cette résection peut-être totale ou partielle. Puis la radiothérapie est pratiquée environ 1 mois après l'exérèse avec une irradiation de 60 Gy au total en 6 semaines (2 Gy/jour, 5 fois/semaine). Le traitement devenu un standard pour le traitement des glioblastomes, combine à la radiothérapie l'utilisation du témozolomide (Stupp *et al.*, 2009; Stupp *et al.*, 2005).

Pour les gliomes de grade III, il existe une grande hétérogénéité de prise en charge de ces tumeurs dans les choix des traitements complémentaires. La place et la chronologie de la radiothérapie et la chimiothérapie n'est pas clairement définie. Il n'y a actuellement pas de standards de soins. La chirurgie est recommandée comme pour les glioblastomes, la radiothérapie sera identique à celle des glioblastomes et pourra être proposée ou non avec le témozolomide. Pour les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes, la procarbazine peut

⁵ Concentration dans le sérum.

également faire partie du traitement. Enfin, face au peu de solutions disponibles, l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques est vivement recommandée (Raghavan *et al.*, 2006; Voges *et al.*, 2003). Dans tous les cas, l'âge du patient, l'indice de Karnofsky⁶, la taille, l'emplacement de la tumeur et les traitements précédents sont des facteurs pris en compte lors du choix du traitement. La biopsie reste fondamentale pour caractériser la tumeur et notamment sa signature moléculaire qui pourra permettre d'anticiper les réponses aux traitements proposés.

III.A. Neurochirurgie des tumeurs cérébrales : développements récents

L'intervention chirurgicale pour les gliomes malins est indispensable à la fois pour établir le diagnostic, réduire la masse tumorale, diminuer l'effet de masse sur les tissus sains environnants (traitement de l'hypertension intracrânienne, récupération d'un éventuel déficit neurologique) et surtout prolonger de façon significative la survie ainsi qu'améliorer la qualité de vie des patients (Voges *et al.*, 2003). Malgré la controverse sur le sujet, une zone de résection importante serait associée avec une augmentation de l'espérance de vie des patients (Sanai and Berger, 2009).

Les avancées technologiques permettent aux neurochirurgiens d'effectuer la résection tumorale avec une plus grande précision. Tout d'abord, pour les tumeurs proches de zone fonctionnelle (zone dite « éloquente »), l'intervention est réalisée sous couvert de l'électrostimulation peropératoire, pour s'assurer de l'absence d'aggravation fonctionnelle. Cette technique requiert, lors de la stimulation de zones du langage que le patient soit conscient pendant l'acte chirurgical, pour permettre l'observation des réponses éventuelles aux stimulations. En ce qui concerne la chirurgie en zone motrice le patient n'est pas éveillé, en effet il suffit simplement de recueillir la contraction grâce à des électrodes.

L'IRM fonctionnelle, technique non invasive, permet aussi de définir les zones éloquentes du cortex. Cette technique étudie, en effet, les modifications de signaux reflétant les variations du débit sanguin lors de tâches précises exécutées par le patient. Les zones dans lesquelles le débit sanguin augmente, témoignent de la présence d'aires activées. L'IRM préopératoire permet de réaliser une cartographie fonctionnelle pour aider à définir le plan chirurgical. Les données recueillies par ces techniques peuvent être intégrées au système de neuronavigation.

⁶ Cet indice mesure la capacité d'une personne à exécuter des actes habituels.

La neuronavigation est un outil interactif permettant au chirurgien de connaître à tout moment la position de ses instruments dans le cerveau, un peu comme le ferait un GPS dans l'espace géographique. Cet outil permet, avant l'intervention, d'optimiser la stratégie neurochirurgicale : localisation de la zone tumorale, choix des limites de l'exérèse pour la protection des zones éloquentes, des artères et des veines et définition des limites de la craniotomie. Pendant l'intervention le chirurgien réalise ses gestes en ayant conscience de la nature fonctionnelle ou non des tissus environnants. Pour s'adapter aux mouvements des structures cérébrales dus à la diminution de l'effet de masse et aux gestes du chirurgien, des explorations per opératoires (pendant l'intervention) peuvent être réalisées tels que l'échographie, la stimulation corticale ou l'IRM, même si celle-ci reste encore rare en per-opératoire (Carpentier, 2008).

La neuroendoscopie est une amélioration majeure de la chirurgie. Elle consiste en l'utilisation d'une caméra fibre optique, appelée endoscope qui peut être couplée à des canaux de travail qui permettent de réaliser des biopsies et des résections. Cette approche utilise les cavités ventriculaires naturelles du cerveau pour atteindre la zone tumorale. Sa petite taille (6 mm de diamètre) permet une approche peu invasive des tumeurs et une bonne compréhension des structures anatomopathologiques.

Une autre approche a fait l'objet d'essai clinique, c'est la résection guidée par fluorescence des gliomes malins (Stummer *et al.*, 2006). La technique implique l'administration orale d'une pro-drogue (précurseur de l'hémoglobine) non fluorescente : l'acide 5-aminolevulinique (ALA) qui après accumulation et métabolisation dans les tissus tumoraux conduit à une porphyrine fluorescente. La détection de cette fluorescence au bloc opératoire *via* l'utilisation d'un microscope opératoire adapté permet de visualiser certains îlots tumoraux, et donc d'optimiser la résection tumorale. Ces essais cliniques ont donné des résultats intéressants en termes de taux de résection de la tumeur et d'augmentation du temps de non progression de cette dernière.

D'autres thérapies, telles que la thérapie photodynamique, le dépôt dans le lit tumoral d'un polymère d'agents actifs et bien d'autres ont été développées mais de par leur utilisation trop complexe et/ou l'absence d'études cliniques convaincantes sur l'amélioration de la survie, elles ne sont pas encore envisagées comme thérapie.

Grâce au développement et à l'utilisation de ces nouvelles techniques d'exploration plus précises et fiables, les limites de la chirurgie peuvent être repoussées tout en respectant l'intégrité du cortex fonctionnel.

III.B. Radiothérapie : progrès récents

Le traitement par radiothérapie consiste en une irradiation ionisante qui détruit les cellules présentes dans la zone d'irradiation, notamment en créant des lésions de l'ADN cellulaire. Tout l'enjeu de cette thérapie est d'augmenter le différentiel entre la toxicité aux tissus tumoraux et celle aux tissus sains. Le fractionnement de l'irradiation qu'il soit temporel ou géométrique permet d'augmenter ce différentiel. Le fractionnement temporel est un traitement standard pour de nombreux cancers, notamment pour les glioblastomes, qui consiste à irradier les patients en plusieurs fractions séparées dans le temps. Le bénéfice, vient du fait que les cellules saines réparent mieux les lésions de l'ADN que les cellules tumorales. Donc, entre chaque fraction d'irradiation les cellules saines récupèrent mieux que les cellules tumorales.

Pour les gliomes de haut grade, le traitement standard de radiothérapie réalisé environ 1 mois après la chirurgie, est une irradiation externe partielle du cerveau avec comme volume recevant la plus forte dose, la zone de tumeur visible à l'imagerie et une marge de 2 cm. La dose totale est de 60 Gy avec des fractions de 1,8 à 2 Gy pendant 6 semaines (5 fois/semaine) (Stupp, 2007; Wen and Kesari, 2008).

L'irradiation par fractionnement géométrique, qui consiste simplement à irradier la cible avec plusieurs incidences, est également une technique courante en radiothérapie. Les techniques d'imagerie, ont permis une avancée notable en renseignant sur la localisation des structures à risques. La capacité à centrer l'irradiation sur la tumeur et à s'adapter aux contours irréguliers des tumeurs a permis des améliorations, principalement en diminuant la dose d'irradiation délivrée aux tissus sains.

Parmi les techniques de radiothérapie innovatrices, on peut citer la radiothérapie par modulation d'intensité (Intensity Modulated Radiation Therapy) qui permet de diviser le faisceau d'irradiation en nombreux petits faisceaux délivrant des doses différentes. Ceci mène à des distributions de dose très complexes qui prennent en compte la forme de la tumeur et les zones à épargner (Ikushima, 2010; Khuntia *et al.*, 2009).

L'irradiation stéréotaxique, appelée aussi radiochirurgie stéréotaxique, est un autre exemple de l'amélioration des techniques d'irradiation. Cette méthode, qui sera abordée plus en détails un peu plus loin, consiste en une irradiation, avec un faisceau étroit de rayonnement ionisant, d'une cible avec plusieurs angles d'irradiation, afin de déposer une dose plus importante au sein de la zone tumorale tout en épargnant les tissus environnants. Cette technique d'irradiation est préconisée pour les métastases cérébrales de petites tailles (moins

de 3 cm) avec un nombre maximum de métastases de 3 ou 4 et parfois pour certains gliomes récidivants.

Il existe aussi une technique d'irradiation interne, la brachythérapie (ou curiethérapie), qui consiste en un dépôt de composés radioactifs (souvent ^{125}I) dans le lit tumoral. Elle est souvent adjuvante à une irradiation externe en tant que boost au niveau de la zone tumorale. Cette technique permet un dépôt de dose important au niveau de la tumeur car la dose diminue très rapidement quand on s'éloigne de la source, ce qui permet d'épargner les tissus sains (Sneed *et al.*, 1996). De plus le faible débit de dose (1cGy/min) comparé à celui d'une irradiation externe (100 à 200 cGy/min) est davantage toléré par les tissus sains, ce qui permet de délivrer une dose plus conséquente (Laperriere *et al.*, 2002). Plusieurs essais cliniques ont été réalisés sur différents types de gliomes, aucun n'a permis d'observer une amélioration de la survie des patients (Laperriere *et al.*, 1998). L'aspect invasif de cette méthode ainsi que le fait que les cellules migrantes tumorales soient épargnées influent sûrement dans le manque d'efficacité de cette méthode sur ces tumeurs très invasives.

Le bore sous forme de différents composés associé à une irradiation neutronique est une thérapie développée depuis environ 50 ans, connue sous le nom de thérapie par capture boro-neutronique (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) (Barth, 2009). Cette méthode utilise l'isotope stable du bore (^{10}B) pour délivrer une dose d'irradiation plus importante localisée. La BNCT permet, après la distribution du bore aux abords des cellules tumorales, de désintégrer ces molécules en particules ionisées grâce à des neutrons, particules ionisées qui ont une haute efficacité biologique et un parcours dans les tissus de 6-7 μm .

De nombreuses études ont portées sur le traitement des gliomes par cette thérapie, et plusieurs évolutions du traitement ont été effectuées aussi bien concernant l'irradiation, la nature des composés ou encore le mode d'injection. Kawabata et coll. ont obtenu une augmentation significative de la médiane de survie de patients atteints de glioblastomes récemment diagnostiqués, suite à l'injection intraveineuse de deux composés borés précédant l'irradiation (Kawabata *et al.*, 2009). Cette thérapie a également été étudiée pour le traitement des tumeurs malignes de l'enfant pour lesquelles la tolérance des tissus cérébraux sains à une radiothérapie classique est très limitée (Nakagawa *et al.*, 2009). Une des limitations de cette technique est d'obtenir une quantité importante de bore de façon sélective dans la zone tumorale afin d'augmenter le différentiel de dose déposée entre les tissus sains et les tissus tumoraux.

III.C. Chimiothérapie

La chimiothérapie ciblant l'ADN fait partie des moyens thérapeutiques complémentaires des gliomes malins pour le traitement de première ligne et en cas de récurrence. Dans ce chapitre, le témozolomide, la carmustine et l'irinotécan qui sont les composés de chimiothérapie utilisés en clinique, ainsi qu'un agent d'immunothérapie, le bévécizumab sont présentés. Leurs modes d'actions feront l'objet d'un autre chapitre.

Des combinaisons d'agents de chimiothérapie peuvent être proposées dans le traitement des gliomes de haut grade récemment diagnostiqués.

III.C.1 Témzolomide

La dernière amélioration notable du traitement des gliomes en termes d'augmentation de survie fait suite aux travaux de Stupp et coll. sur le témozolomide. Cette étude a porté sur deux groupes d'études, un comportant 286 patients traités par radiothérapie et un second de 287 patients traités par une combinaison de témozolomide et de radiothérapie. Pour la plupart des cas, une chirurgie partielle ou totale a été réalisée avant ce traitement. Le témozolomide (Témodal®) a permis de porter la survie médiane des patients atteints de glioblastomes de 12,1 à 14,6 mois (Figure 7) et également d'augmenter la survie à 5 ans. Aucune toxicité additionnelle du traitement n'a été observée.

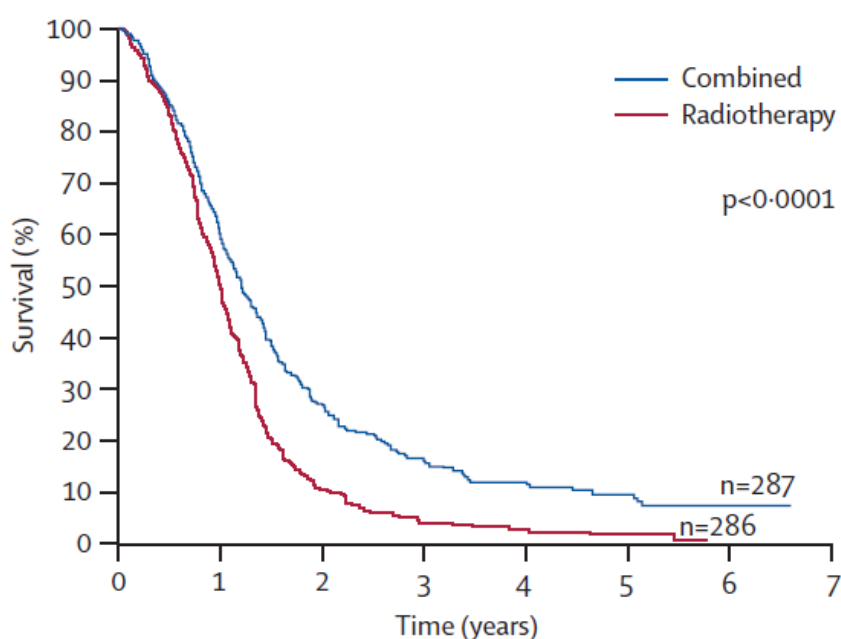


Figure 7 : Courbes de Kaplan-Meier des patients traités par radiothérapie (60 Gy par fraction de 2 Gy, 6MV) ou par la combinaison du témozolomide avec l'irradiation (Stupp *et al.*, 2009).

Le témozolomide est aujourd'hui administré par voie orale avec la posologie suivante : 75 mg/m²/jour, en concomitance avec la radiothérapie, suivi par 6 cycles de 28 jours pendant lesquels le Témodal® est pris pendant 5 jours (150 à 200 mg/m²/jour) (Stupp *et al.*, 2009; Stupp *et al.*, 2005). C'est sûrement celui des deux agents de première ligne qui est le plus employé de par sa grande facilité d'administration. Nous détaillerons par la suite, les progrès réalisés dans la prédiction de la réponse à ce traitement.

III.C.2 Carmustine

La carmustine (BCNU), quant à elle, est lipophile et passe la BHE, elle peut donc être prescrite sous deux formes : par injection intraveineuse ou sous forme d'implants (Gliadel®, décrit ci-dessus). La chimiothérapie interstitielle avec le gliadel est une approche à envisager quand la situation topographique de la tumeur, la qualité de l'exérèse et de la cavité opératoire et l'état clinique du patient le permettent. La carmustine a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) sous ces deux formes de prescription pour le traitement des gliomes malins et ceci aussi bien pour les gliomes récemment diagnostiqués que pour les récurrences (8, 24). Des études en cours évaluent l'efficacité et l'éventuelle toxicité de l'association gliadel/témodal/radiothérapie et les premiers résultats sont encourageants tant sur le plan des effets secondaires que sur l'efficacité d'un tel traitement même si la publication des résultats d'essais cliniques de phase III est encore attendue (Menei *et al.*, 2010).

III.C.3 Chimiothérapie alternative pour la récurrence

La récurrence pour les gliomes de haut grade est malheureusement observée dans la majorité des cas. Là encore, aucun traitement standard n'a été défini et plusieurs alternatives sont envisageables. Les anticancéreux tels que l'irinotécan peuvent être proposés.

L'irinotécan (Campto®, CPT-11) qui est utilisé en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents actifs dans plusieurs cancers est un dérivé de la camptothécine (alcaloïde naturel) qui traverse la BHE. C'est un inhibiteur de la topoisomérase I, enzyme critique dans la transcription d'ADN. Son mode d'action diffère de celui des autres agents de chimiothérapie, ce qui peut expliquer que l'irinotécan se soit révélé efficace pour le traitement des gliomes malins, notamment en combinaison avec un agent anti-angiogénique, le bévécizumab (Reithmeier *et al.*, 2010).

Les gliomes de haut grade ressemblent à de nombreuses tumeurs de par le fait qu'ils comportent un cœur nécrotique cerclé de cellules tumorales angiogéniques, mais elles en

différent par le caractère très migratoire de ces cellules tumorales. L'utilisation d'agents anti-angiogéniques et plus particulièrement le bévacizumab, qui ciblent les facteurs de croissance responsables du développement de ces cellules migrantes a permis d'obtenir des résultats intéressants sur les glioblastomes en récurrence. Le bévacizumab (Avastin®) est un anticorps monoclonal qui se lie au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et inhibe de ce fait la liaison de ce même facteur à ses récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales. Cette inhibition induit une diminution de la prolifération des cellules endothéliales et donc une diminution de la croissance de micro-vaisseaux sanguins qui nourrissent la tumeur. Ce composé est préconisé en injection intraveineuse tous les 15 jours. De plus, l'utilisation d'agents anti-angiogéniques diminue les symptômes tels que l'œdème cérébral, luttant donc sur l'hypertension intracrânienne induite par la tumeur.

Ces deux composés sont donc des alternatives utilisés seuls ou combinés pour les cas de récurrence. D'autres schémas thérapeutiques peuvent être prescrits tel que la combinaison procarbazine/carmustine/vincristine.

La chimiothérapie ciblant le métabolisme de l'ADN (alkylants, intercalants) et du fuseau mitotique fait partie des moyens thérapeutiques complémentaires des gliomes malins. La combinaison d'agents actifs avec des mécanismes d'action différents représente une grande partie des essais cliniques sur les gliomes, mais aucun n'a pour le moment permis une amélioration significative.

Outre le développement des traitements classiques, de nouvelles voies de thérapie apparaissent (Van Meir *et al.*, 2010). Ces techniques portent sur une connaissance de plus en plus étendue de la biologie même des gliomes, notamment sur l'identité moléculaire des tumeurs et sont de natures diverses : agents anti-néoangiogénèse, modificateurs de l'immunité et thérapies géniques.

IV. Dommages de l'ADN

L'ADN a été la première cible des agents de chimiothérapie, même si aujourd'hui l'intérêt pour d'autres cibles se développe. L'ADN assure à la fois la transmission de l'information génétique et la synthèse des protéines. Cette biomolécule est un polymère composé de 4 nucléotides différents, eux-mêmes composés d'un sucre, d'une base permettant les interactions inter-brins et d'un groupement phosphate assurant l'unité du brin. Les 4 bases de l'ADN sont l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et thymine (T). Lors de l'étape

de transcription l'ADN est transcrit en ARN puis cet ARN conduit à la synthèse des protéines lors de l'étape de traduction. C'est particulièrement parce que cette molécule est responsable du bon fonctionnement de la cellule qu'elle est naturellement la principale cible des agents de chimiothérapie. L'engouement pour cette molécule depuis sa découverte, que ce soit pour ses différentes structures, ses mécanismes de transcription ou bien encore ses dommages et ses systèmes de réparation, contribue aussi à son statut de cible privilégiée.

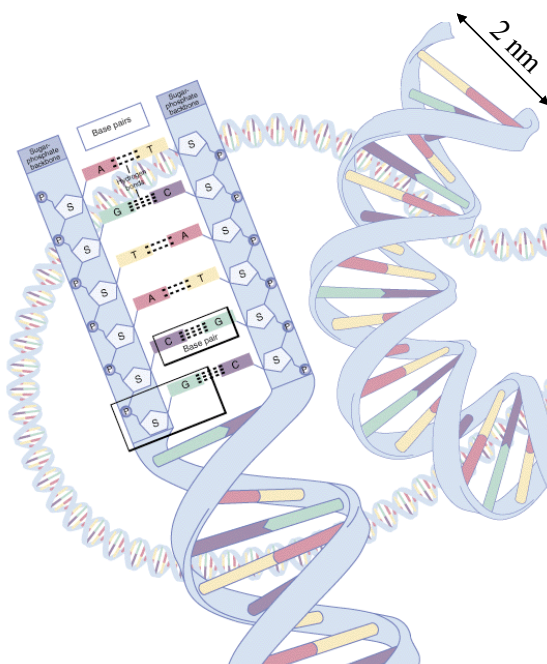


Figure 8 : Molécule d'ADN.

L'ADN subit continuellement des dommages, qui sont de natures diverses et d'origines endogène ou exogène. Ils sont estimés à environ 20 000 par cellule et par jour (Friedberg E C., 2005). Les dommages endogènes, tout d'abord, sont nombreux et variés : hydrolyse des purines, déamination de la cytosine, méthylation des bases, réaction avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant cassures simple ou double-brins, ainsi que des pontages ADN/ADN ou ADN/protéines. Il existe aussi des dommages induits par l'environnement tels que le tabac, les agents chimiques, le rayonnement UV et les rayonnements ionisants. Ces dommages peuvent intervenir en plusieurs lieux de la structure d'ADN : sur les bases avec des modifications de la base mais aussi des pontages intra-brins

ou inter-brins, sur le sucre avec l'apparition de forme abasique⁷ ou sur le phosphate avec des cassures simple brin.

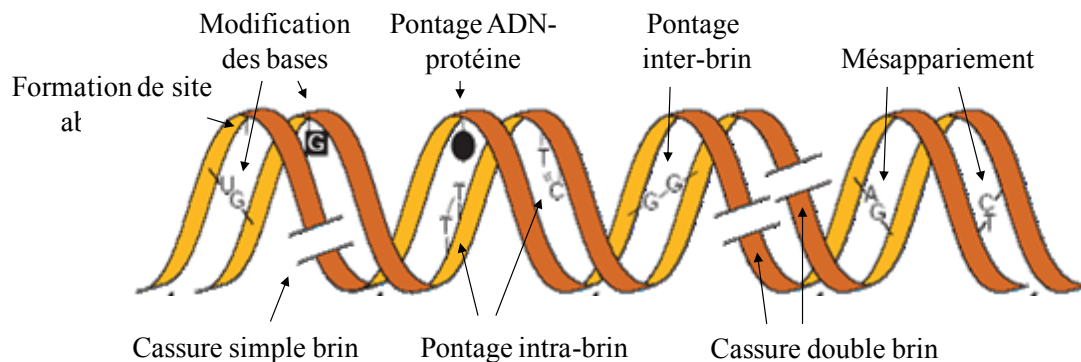


Figure 9 : Différentes lésions de l'ADN adaptée de (Hoeijmakers, 2001).

IV.A. ADN et rayonnement ionisant

Le rayonnement ionisant a des effets à la fois directs sur l'ADN : l'ionisation des bases ou des sucres, et des effets indirects : les radicaux libres créés suite à la radiolyse de l'eau ou à l'ionisation des molécules environnantes. Selon les qualités du rayonnement ionisant, la densité d'énergie déposée localement varie. Ce paramètre peut-être quantifié par une grandeur nommée transfert d'énergie linéique (TEL). Le TEL est défini comme l'énergie transférée par unité de longueur le long de la trajectoire du rayonnement. Pour des rayonnements tels que le rayonnement γ et les rayons X ce facteur est petit : de l'ordre de 0,3 à 2 keV/ μm alors qu'il est très élevé pour des particules α . Pour les rayonnements de faible TEL, la majorité des dommages de l'ADN paraît être causée par les effets indirects des radicaux alors que le reste des dommages ferait suite à des ionisations directes. Les rayonnements ionisants induisent une grande variété de lésions : altérations de bases et de sucres, cassures simple-brin, cassures double-brin, pontage intra-brins ou inter-brins et pontages ADN-protéines. Ces lésions radio-induites sont en général plus complexes que les lésions endogènes, non pas, par leur nature, mais plutôt par leur densité élevée. Des études *in vitro* sur de l'ADN irradié en solution ont permis de déterminer la nature chimique de plusieurs dommages de l'ADN, à la fois sur la base mais aussi sur le sucre. Les dommages induits par la modification des bases sont nombreux et on peut notamment citer : pour la cytosine : 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyhydantoïne, formamide, pour la thymine : diols de thymine, 5-formyluracyle, pour l'adénine : 8-oxo-7,8-dihydroadénine (8-oxoAde),

⁷ Perte de la base

4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) et enfin pour la guanine : l'oxazolone et la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). Cette liste est loin d'être exhaustive. L'analyse de la littérature indique que la quantification des lésions est dépendante de la méthode de dosage utilisée. Pour exemple, la détermination de la quantité de 8-oxoGua, marqueur courant de l'oxydation de l'ADN, ne donne pas les mêmes résultats selon qu'elle est réalisée par HPLC-MS/MS ou par la méthode des comètes (Cadet *et al.*, 2002). Il faut donc se montrer prudent face aux nombres et à la fréquence des lésions annoncées dans les différents travaux à moins que ceux-ci ne soient validés par plusieurs techniques d'analyse.

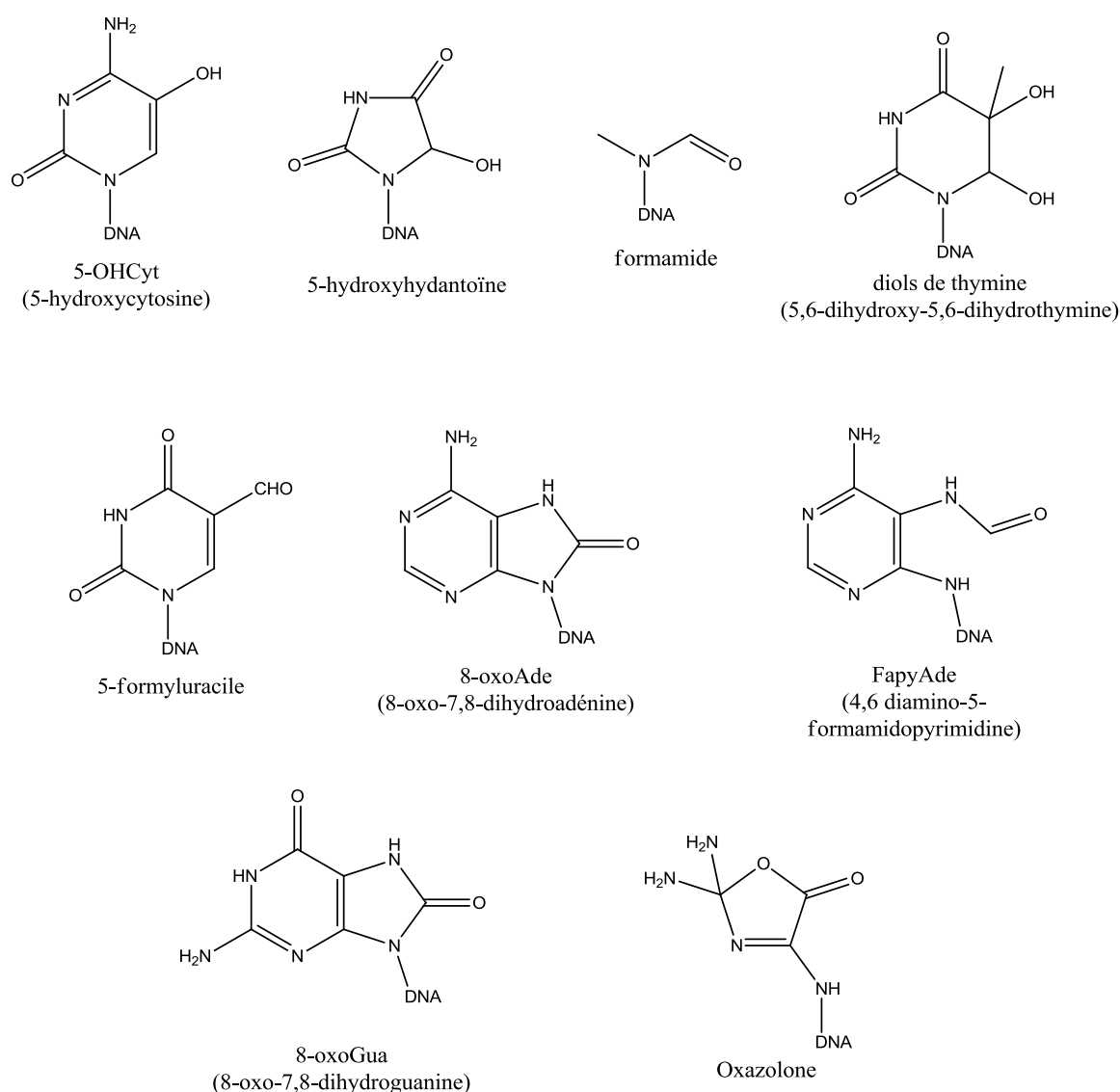


Figure 10 : Exemples de dommages oxydatifs de l'ADN adaptés de (Cadet *et al.*, 2003) et (Cadet *et al.*, 1997).

Concernant le sucre, l'attaque du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) produit soit une cassure simple brin soit un site abasique. Le taux de formation de SSB est linéaire en fonction de la

dose et est plus élevé à faible TEL qu'à haut TEL. Leur réparation dans les cellules de mammifères est très rapide (moins d'une heure). Une cassure double brin est une rupture des deux brins d'ADN à des sites distants de quelques nucléotides. Les DSB sont des lésions très délétères et une grande partie de la toxicité du rayonnement ionisant leur est imputé. Leur induction, comme celle des SSB est corrélée à la dose par une fonction linéaire. Les DSB peuvent être létales ou mener à des réarrangements chromosomiques. Enfin, le radical hydroxyle provoque la formation de pontages intra-brins et inter-brins, ainsi que des pontages ADN-protéines.

Ces différentes lésions peuvent être prises en charge par divers systèmes réparation.

Outre les lésions « classiques » de l'ADN, des clusters de lésions de l'ADN, définies comme la présence de 2 lésions ou plus dans un ou 2 tours d'hélice de l'ADN le long d'une trajectoire de rayonnement, se forment aussi suite à une irradiation ionisante. Dès les années 80, Ward introduit l'idée de la présence de ces clusters alors appelés dommages multiples localisés (LMDS). Ces sites multi-lésés semblent être propres aux rayonnements ionisants et aux drogues radiomimétiques. Ces clusters seraient constitués majoritairement par des bases modifiées telles que la 8-oxoGua et les diols de thymine, des sites abasiques (apurinique et apyrimidique), la 2-désoxyribolactone, des SSB ou des DSB. La complexité des dommages croît avec l'augmentation du TEL du rayonnement. D'après des modélisations biophysiques avec un rayonnement de faible TEL tel que le rayonnement γ , 30% des DSB formés sont complexes. L'exposition de cellules mammifères aux rayonnements ionisants induit 4 à 8 fois plus de cluster de dommages (non DSB) que de DSB. Plusieurs études réalisées sur des modèles de cluster de dommages de l'ADN ont révélées que la réparation des lésions d'un cluster est prise en charge par le BER, bien que selon la position des lésions entre elles, l'efficacité du BER peut être modulée. Une hiérarchie dans l'ordre des réparations a pu être établie dans certaines études réalisées avec des extraits cellulaires. Pour le cas de cluster contenant un site abasique et des bases endommagées, l'excision du site AP est d'abord réalisée ce qui retarde l'excision des bases modifiées jusqu'à ce que la SSB résultante soit prise en charge. L'existence de cette hiérarchie a l'avantage de prévenir les DSB mais peut aussi induire, par le retard d'excision d'autres types de lésions, des mutations dues à l'augmentation du temps de vie des lésions dans le cluster qui peuvent persister lors de la réplication. Cette hiérarchie a été confirmée dans les cellules eucaryotes pour lesquelles il a été prouvé que le retard dans la réparation peut mener soit à une augmentation des mutations par rapport aux lésions isolées, soit à la formation de DSB, selon la nature et la position des

lésions constituant le cluster. Beaucoup d'études portent sur l'étude de cluster contenant 2 lésions, quelles soient dites "en tandem" (les 2 lésions sont juxtaposées sur le même brin d'ADN) ou bien bicaténares. Or les réponses à ces lésions en terme de réparation sont diverses et varient par leur position et leurs nombres.

Pour exemple, quand la 8-oxoGua est en tandem avec un site AP, la fréquence de mutation de 8-oxoGua est réduite. Lorsque la 8-oxoGua est présente dans un cluster contenant un site AP bicaténaire, la formation des DSB n'est pas évitée. Cependant, quand 2 lésions 8-oxoGua sont opposées à un site AP, les DSB ne sont pas formées mais l'incidence des mutations est élevée (Eccles *et al.*, 2010). Aux DSB « primaires » viennent donc s'ajouter les DSB issues des clusters de dommages de l'ADN.

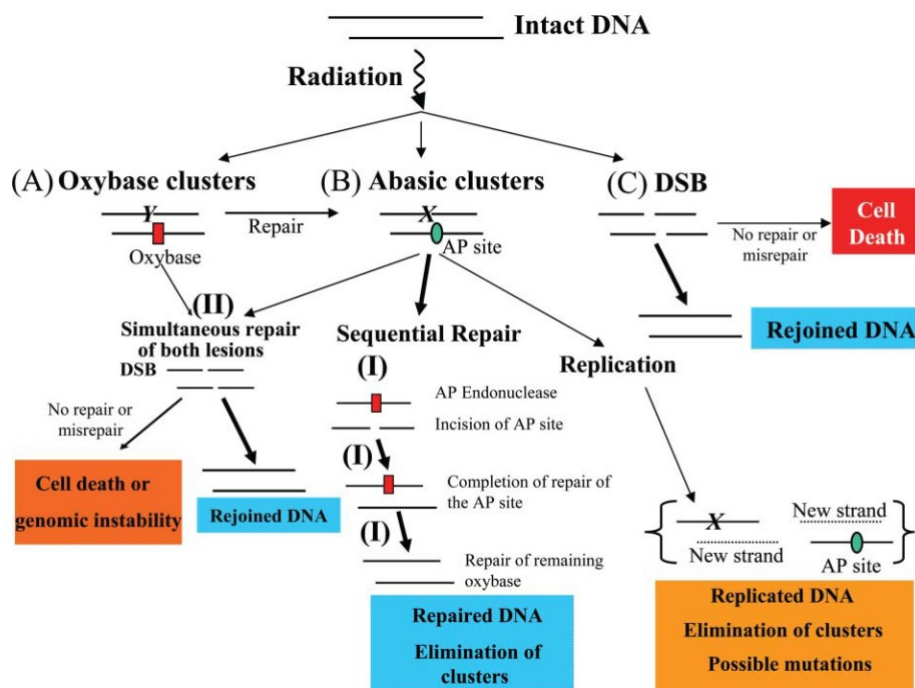


Figure 11 : Modèle de réparation des clusters de dommages de l'ADN bicaténares et des DSB fondé sur les connaissances actuelles (Georgakilas, 2008).

Les systèmes de réparation peuvent se révéler plus ou moins efficaces en fonction de la nature de la lésion mais aussi du statut génétique de la personne concernée, tout le monde n'ayant pas des systèmes de réparation rigoureusement identiques. Ces systèmes peuvent, réparer correctement le dommage ce qui n'induit aucune toxicité pour la cellule, mais ils peuvent aussi ne le réparer que partiellement et ceci peut entraîner la mutagenèse. Enfin une partie des lésions peut ne pas être réparée et entraîner la cellule dans un processus d'apoptose.

IV.B. ADN et agents de chimiothérapie

Parmi les agents de chimiothérapie devenus incontournables dans le traitement de nombreux cancers, la majeure partie agit sur l'ADN. La famille des agents alkylants, qui est la plus vieille classe d'anticancéreux, a été développée à partir du malheureusement bien connu "gaz moutarde". L'utilisation clinique de tels composés débute dès 1942. Ces composés sont électrophiles et s'additionnent sur tous les sites nucléophiles cellulaires, mais leurs effets résultent majoritairement de leurs réactions sur l'ADN. Selon que l'agent est mono-fonctionnel ou bi-fonctionnel, on observe une simple alkylation d'un des brins de l'ADN ou bien un pontage inter ou intra-brins. Par abus de langage, beaucoup de composés agissant sur l'ADN sont dénommés comme des agents alkylants, or le cisplatine par exemple bien que s'additionnant sur l'ADN, n'alkyle pas l'ADN. Les agents alkylants présentés ici sont la cyclophosphamide, le témozolomide et la carmustine (Middleton and Margison, 2003).

- **Moutarde azotée**

Les moutardes azotées sont des agents alkylants bi-fonctionnels dont le motif commun est le N,N-di-2-chloroéthylamine. Parmi ces composés on trouve la cyclophosphamide, qui est utilisée en tant qu'alternative dans le traitement des gliomes de haut grade. Cette prodrogue, est oxydée lors de sa métabolisation en hydroxycyclophosphamide, forme qui est en équilibre avec l'aldophosphamide. Ce produit traverse la membrane cellulaire et forme le métabolite appelé "moutarde phosphamide" qui s'additionne ensuite sur l'ADN (Hall and Tilby, 1992). Il réagit notamment avec la guanine de l'ADN via l'intermédiaire aziridium pour former un dérivé N⁷-alkyl guanine. Ce monoadduit peut de la même façon donner lieu à la formation du 2-hydroxyéthyl guanine ou au pontage inter-brin entre deux guanines, suite à la réaction respectivement, avec une molécule d'eau ou avec une seconde guanine, comme représentés ci-dessous (Noll *et al.*, 2006).

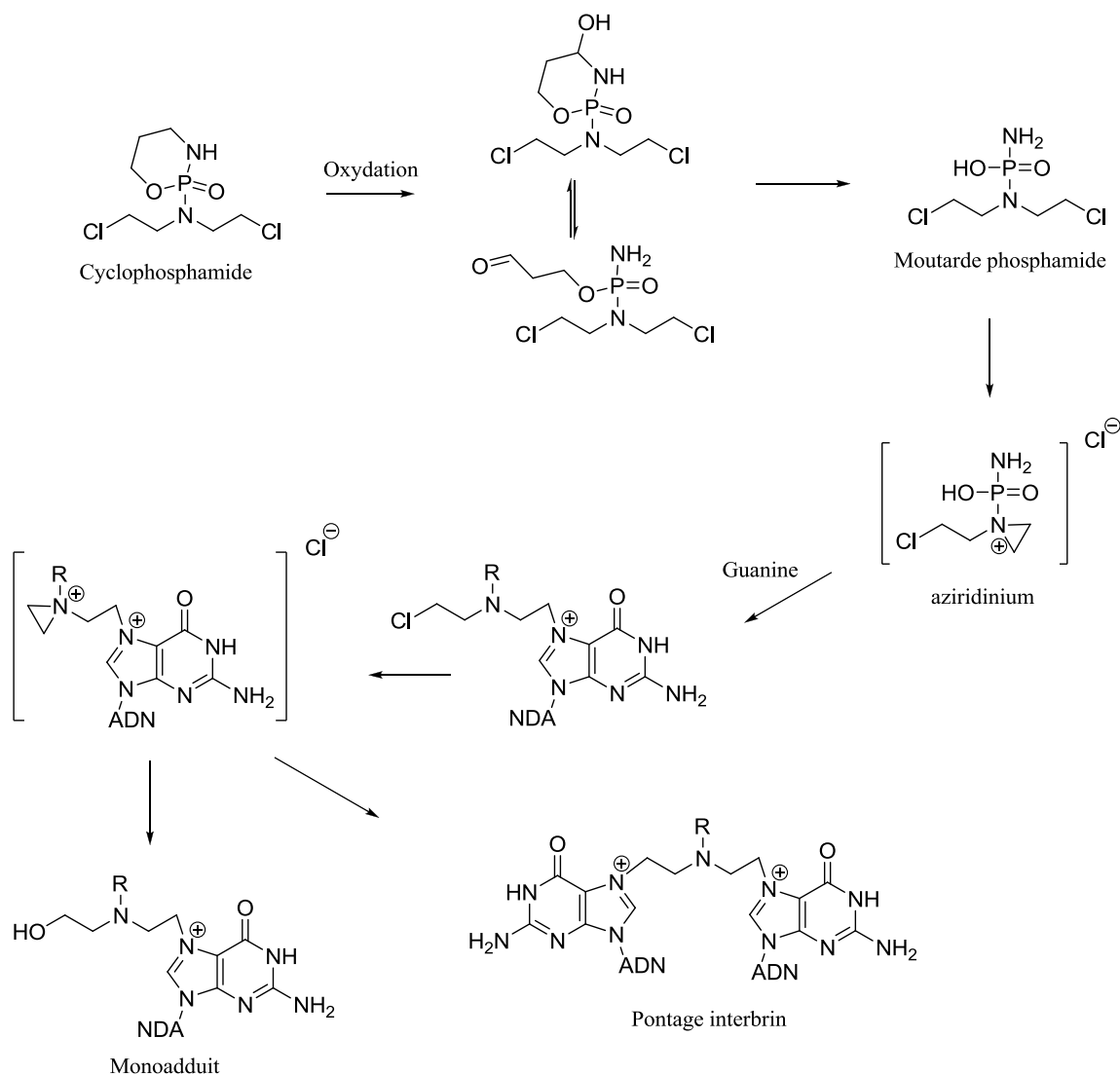


Figure 12 : Dommages de l'ADN induits par la cyclophosphamide adaptée de (Hall and Tilby, 1992) et (Noll *et al.*, 2006).

Le N⁷-alkyl guanine peut conduire après clivage de la liaison glycosidique au site abasique ou bien après ouverture du cycle imidazole au composé FapyGua. Ces dommages de l'ADN ainsi que les pontages sont ensuite pris en charge par les systèmes de réparation avec plus ou moins de succès.

- **Témozolomide**

Le témozolomide est une pro-droque qui offre l'avantage de pénétrer la BHE. La méthylation de l'ADN semble être le principal mécanisme responsable de la cytotoxicité du témozolomide. Sous conditions physiologiques, le témozolomide est converti en espèce méthylante par ouverture du cycle et libération de CO_2 . Ce composé est ensuite dissocié en

5-aminoimidazole-4-carboxamide et en méthyldiazonium (Figure 13). Toutes ces réactions se font sans intervention du métabolisme. L'attaque d'un site nucléophile de l'ADN sur le méthyldiazonium conduit à la méthylation de l'ADN (Denny *et al.*, 1994).

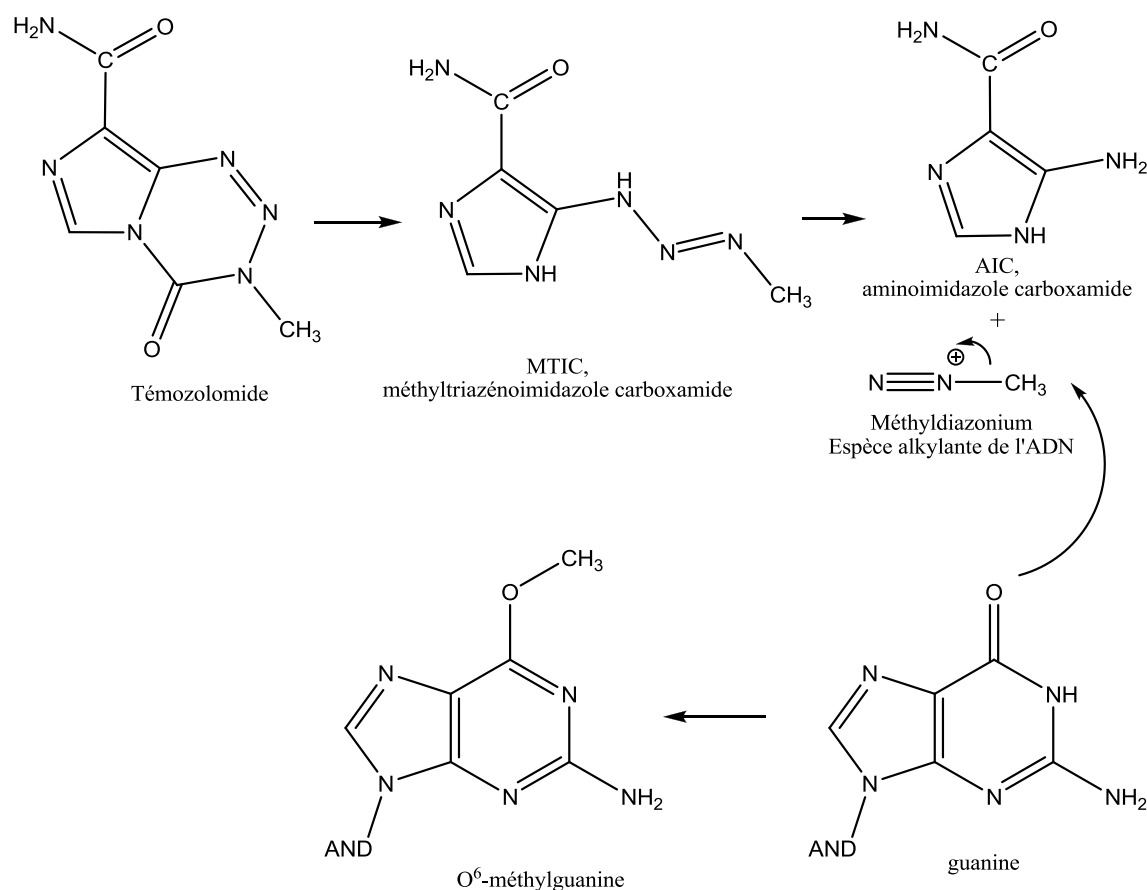


Figure 13 : Mécanisme d'action du témozolomide sur l'ADN adapté de (Denny *et al.*, 1994) et (Friedman *et al.*, 2000).

Parmi les lésions de l'ADN produites après traitement avec le témozolomide, les plus fréquentes sont la N⁷-méthylguanine, la O³-méthyladénine et la O⁶-méthylguanine (Friedman *et al.*, 2000). Le rôle des 2 adduits N⁷-méthylguanine et O³-méthyladénine dans l'activité tumorale est assez controversé. L'adduit O⁶-méthylguanine, qui représente 5% de tous les adduits formés par le témozolomide, jouerait un rôle important dans l'activité anti-tumorale de cet agent. Ceci est notamment supporté par la corrélation entre la sensibilité des cellules tumorales au témozolomide et l'activité de la protéine de réparation, la O⁶-alkylguanine alkyltransférase.

- **Nitroso-urées et dérivés**

La carmustine (BCNU) et la lomustine (CCNU) peuvent être proposées comme alternatives dans le traitement des gliomes récidivants. La carmustine est un agent alkylant de la famille des nitroso-urées de très petites tailles, ce qui lui permet de passer la BHE. Le groupement cyclohexyle de la lomustine rend le composé plus hydrophile et donc plus à même de traverser la BHE.

Les adduits de l'ADN formés par ces deux composés sont de plusieurs natures et sont à l'origine de leur cytotoxicité. Trois types de modifications de bases ont été identifiés : des bases purines monosubstituées, des bases éthano exocycliques et des pontages. La Figure 14 présente quelques uns des dommages (monoadduits, adduits exocycliques et pontages) de l'ADN induit par le carmustine (Ludlum, 1997).

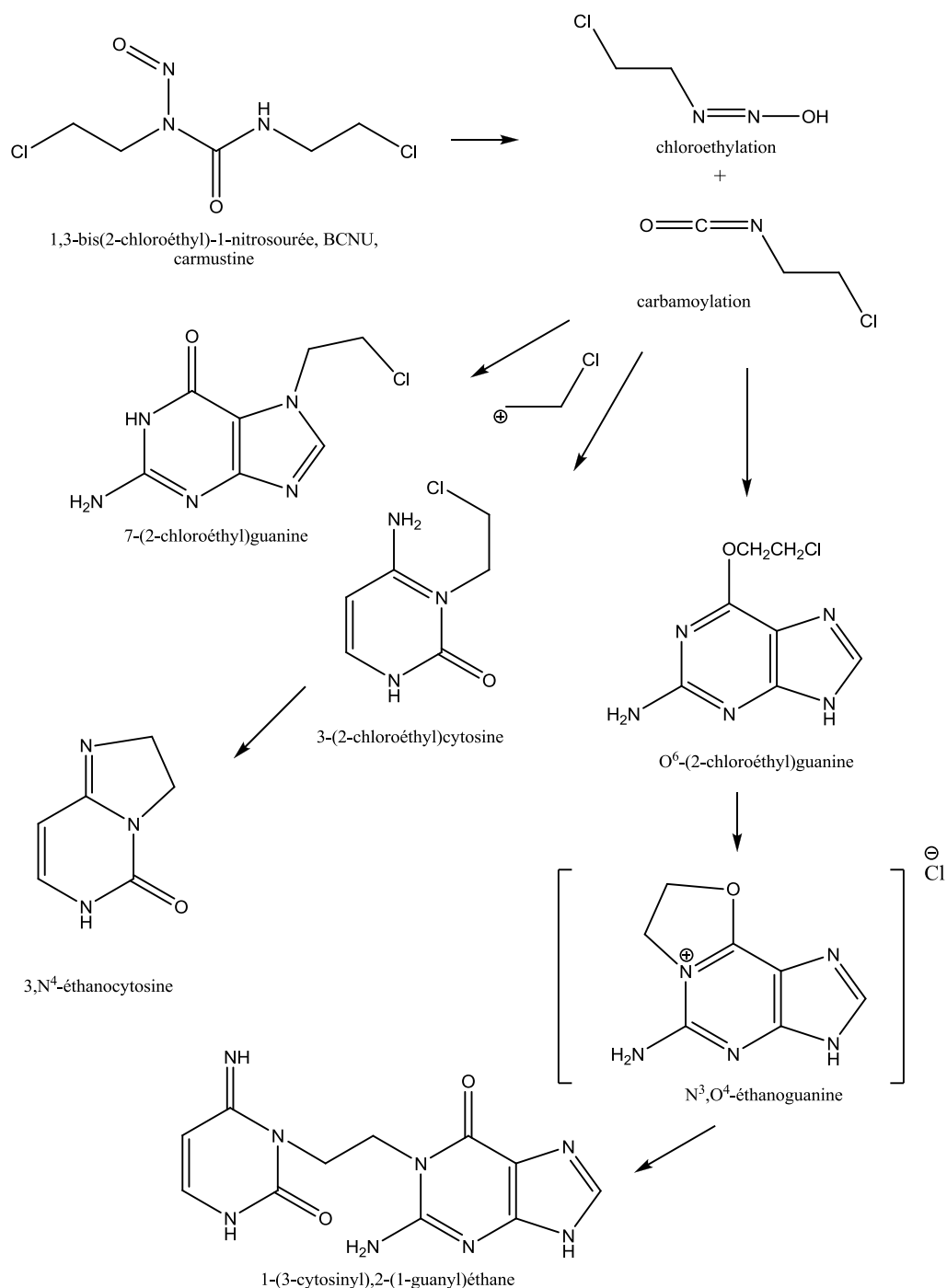


Figure 14 : Dommages de l'ADN induits par la carmustine adaptée de (Ludlum, 1997) et (Tong *et al.*, 1982).

Les conséquences de chacune des ces lésions de l'ADN ne sont pas encore bien connues mais il semblerait que les pontages soient responsables de la cytotoxicité, tandis que les adduits monofonctionnels mèneraient aux effets mutagène et carcinogène (Guliaev *et al.*, 2004).

• Composés platinés

Le cisplatine est un des composés de chimiothérapie le plus utilisé. Sa première autorisation de mise sur le marché date de 1978, dans le cadre du traitement des cancers des testicules et des ovaires, pour lesquels il se révèle très efficace. Le composé platiné peut entrer dans la cellule soit par diffusion passive à travers la membrane, soit *via* des transporteurs, les transporteurs de Cu étant les plus connus. Une fois dans la cellule, la concentration en ions chlorures moins élevée induit le déplacement des deux groupements chlorures par des molécules d'eau, formant ainsi un complexe électrophile capable de réagir avec les sites nucléophiles des macromolécules (Figure 15). Seul 1% du cisplatine intracellulaire réagit sur l'ADN pour former des adduits. La pénétration du cisplatine dans le noyau serait assistée par une chaperone⁸ (Safaei, 2006). L'addition du cisplatine sur de nombreux sites nucléophiles est responsable à la fois de son activité antinéoplasique mais aussi de sa néphrotoxicité, effet secondaire majeur et facteur limitant de l'utilisation de cet agent anticancéreux.

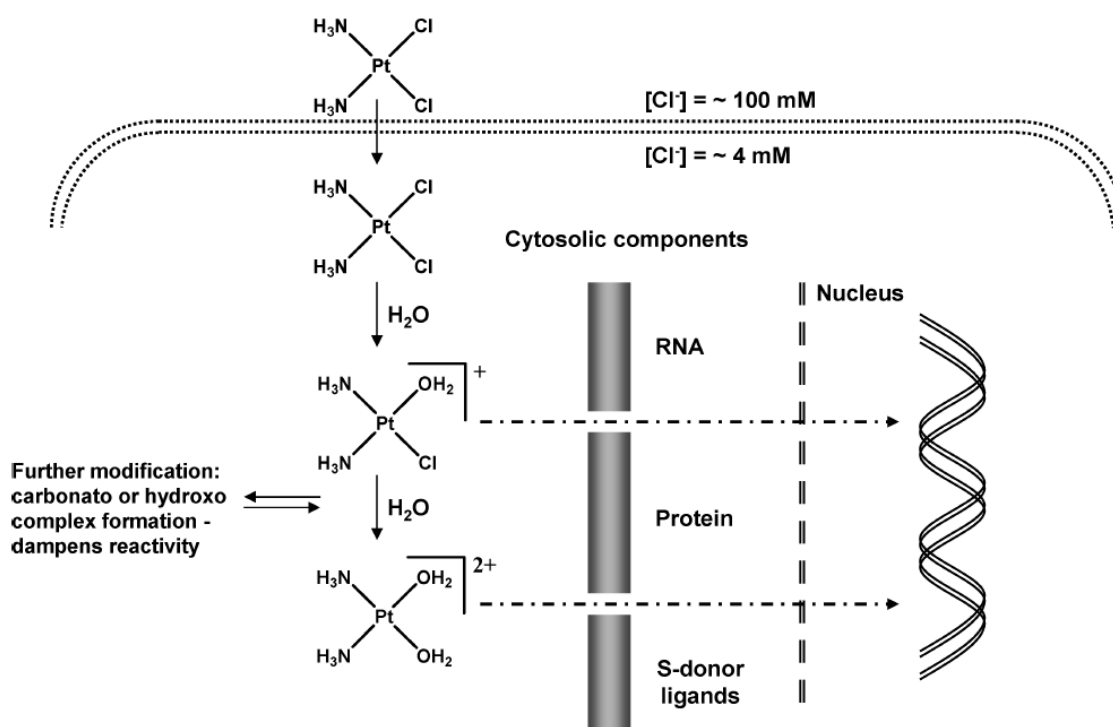


Figure 15 : Pénétration du cisplatine dans le noyau cellulaire (Jung and Lippard, 2007).

Le carboplatine est un dérivé du cisplatine, qui diffère de celui-ci par son groupement partant, un ligand carboxylate remplace en effet les ligands chlorures du cisplatine, ce qui lui confère une cinétique de réaction plus lente. Il est également moins néphrotoxique.

⁸ Protéine qui assiste d'autres protéines et qui peut être impliquée dans le transport transmembranaire.

Ces deux composées forment les mêmes adduits de l'ADN. L'adduit intra-brins entre deux N7 de guanine (1,2-d(GpG)-Pt) est l'adduit majoritairement formé (approximativement 60% des adduits), vient ensuite l'adduit intra-brins entre une guanine et une adénine (1,2-d(ApG)-Pt), enfin le pontage inter-brins entre 2 guanines (1,2-d(GG)-Pt), le pontage intra-brins entre deux guanines distantes d'une base (1,3-d(GpNpG)-Pt) et le mono-adduit de la guanine (dG-Pt) sont observés en quantités moindres. Les pontages entre deux guanines sont représentés sur la Figure 16.

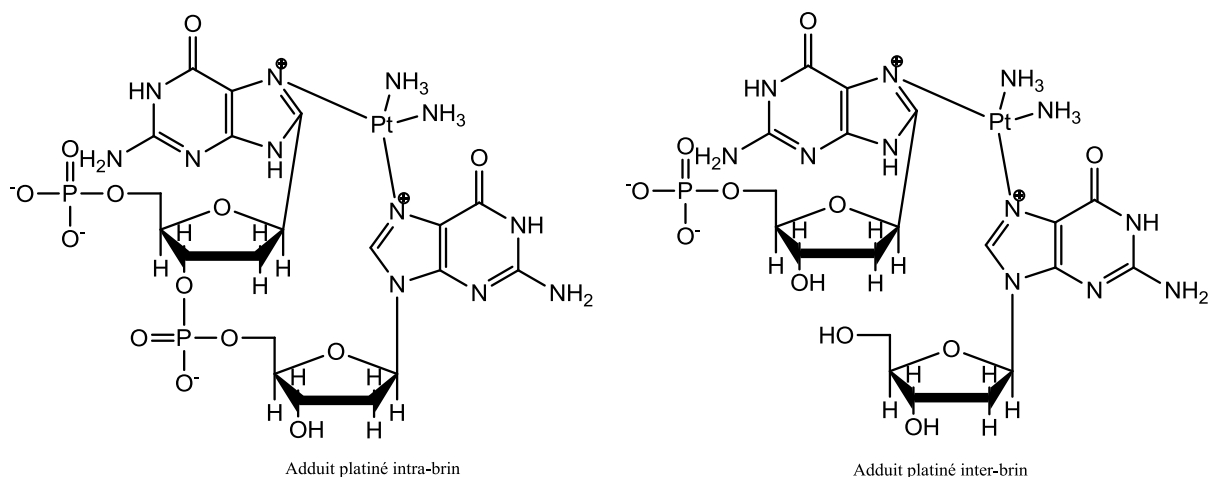


Figure 16 : Adduits intra et inter-brins du cisplatine avec l'ADN adaptée de (den Hartog *et al.*, 1982).

Ces adduits altèrent significativement la structure de l'ADN, comme on peut le voir sur la Figure 17, sur laquelle sont représentées les structures de plusieurs adduits du cisplatine avec l'ADN.

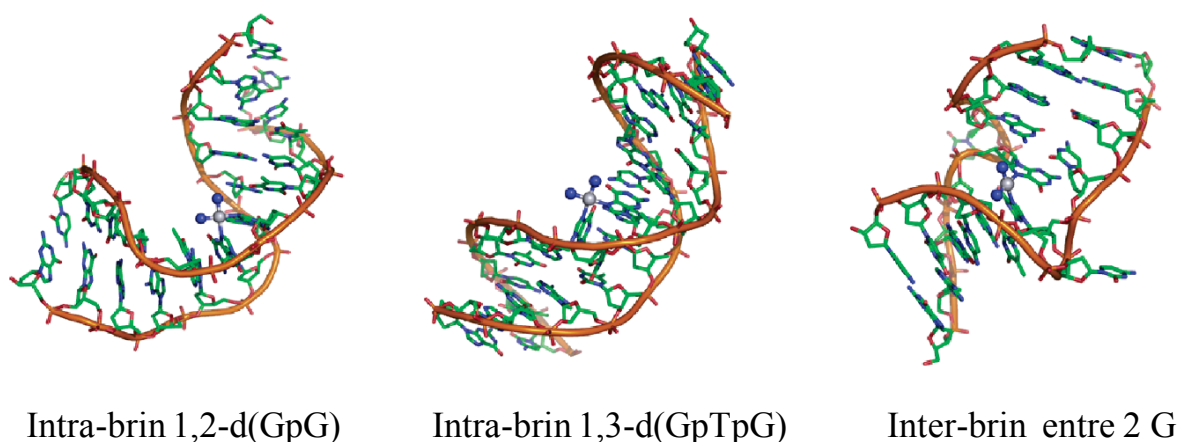


Figure 17 : Structures des adduits du cisplatine avec l'ADN (Jung and Lippard, 2007).

Ces modifications de la structure de la double hélice ont plusieurs conséquences sur la structure des complexes ADN-protéines et sur la capacité du duplex à jouer le rôle de modèle pour la réplication et la transcription de l'ADN. Ces changements de conformation de l'ADN permettent aussi la reconnaissance des lésions par les systèmes de réparation.

- ***Irinotécan***

Les topoisomérases I et II sont des enzymes qui relaxent l'ADN surenroulé lors des processus de transcription et de réplication de l'ADN. Cette relaxation se fait en plusieurs étapes : d'abord une cassure mono ou bi-caténaire de l'ADN, puis la relaxation d'un tour de l'hélice d'ADN et enfin une religation de l'ADN. L'irinotécan est métabolisé partiellement par des carboxyestérases, le métabolite SN-38 obtenu est plus actif que le produit de départ. Après fixation de la topoisomérase I par une liaison covalente avec une extrémité 3' de l'ADN, l'inhibiteur se lie au complexe et le rend stable, ce qui inhibe l'étape de religation. Lors de la réplication de l'ADN, la fourche de réplication entre en collision avec le complexe, ce qui engendre une coupure double-brin de l'ADN, à l'origine de la cytotoxicité de l'irinotécan et qui induit l'apoptose (Rothenberg, 1997).

IV.C. Systèmes de réparation

Il existe différents systèmes de réparation. Tous les processus de ces systèmes sont loin d'être complètement compris car de nombreux composés entre en jeu lors de la réparation des dommages. Ici, ces systèmes seront abordés de façon sommaire (Tubiana, 2008).

- ***Réversion directe du dommage***

Il existe plusieurs exemples de réversion directe du dommage qui ne nécessite l'intervention que d'une seule enzyme. Parmi ces exemples, on peut citer la ligation de cassure simple brin portant une extrémité 3'-OH par l'ADN ligase I et la réparation des bases alkylées par une alkyltransférase. Parmi les agents de chimiothérapie on trouve notamment des agents alkylants de l'ADN tel que les nitrosourées, la procarbazine et le témozolomide. L'effet cytotoxique du témozolomide et de la carmustine provient du fait que ces deux composés méthylent la position O⁶ de la guanine. La O⁶-alkylguanine transférase est une enzyme suicide qui transfère le groupe méthyl de la position O⁶ de la guanine vers une des cystéines la constituant (Figure 18). Le niveau d'expression de cette enzyme est d'ailleurs

responsable de la résistance au traitement par le témozolomide des patients atteints de gliome (Scharer, 2003).

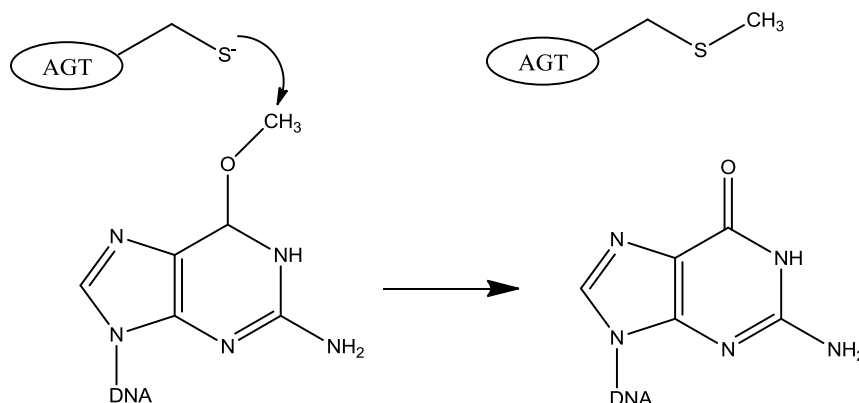


Figure 18 : Mécanisme de réparation par la O⁶-alkylguanine transférase (Scharer, 2003).

- **Synthèse translésionnelle**

La synthèse translésionnelle consiste à répliquer l'ADN sans tenir compte des lésions présentes sur le brin modèle. Les polymérases de réplication classique de l'ADN (α , θ , et ϵ) ne peuvent pas contourner la lésion, cependant certaines polymérases (β , η et ζ) sont capables d'insérer des bases normales en face de lésions. Suite à leur recrutement après le blocage des polymérases, ces enzymes de part leur site actif plus ouvert sont capables de prendre en charge les lésions et de répliquer l'ADN avec une grande efficacité (du moins pour la polymérase η).

- **Réparation des mésappariements (mismatch repair, MMR)**

Cette voie de réparation prend en charge les bases mal appariées. Ce système comporte 4 phases : la reconnaissance de la base mal appariée, l'élimination d'un fragment d'ADN comportant la base non complémentaire, la resynthèse des nucléotides et enfin la ligation des deux extrémités du brin d'ADN.

En éliminant des erreurs commises par les polymérases lors de la réplication de l'ADN, le système MMR améliore la fidélité de la réplication de plusieurs ordres de grandeur et préserve donc la cellule d'une grande instabilité génétique. Aucune des bases n'étant endommagée, c'est la base portée par le néo-brin qui est excisée, ce brin est distingué du brin parent par son moindre degré de méthylation. Une déficience dans ce système de réparation prédispose alors au cancer (cancer du colon et des ovaires notamment). Ce système répare

également les dommages induits par plusieurs classes de composés actifs cliniquement tels que le témozolomide, le cisplatine, le carboplatine, les thiopurines (Kinsella, 2009).

- **Réparation par Excision de Bases (BER)**

Le système de Réparation par Excision de Bases (BER) prend en charge les modifications de bases, qui sont des petites lésions et les SSB. Ce système comporte 2 voies enzymatiques qui se distinguent par l'insertion d'une ou deux bases (short patch repair) ou l'insertion d'environ 2 à 8 bases (long patch repair) (Figure 19).

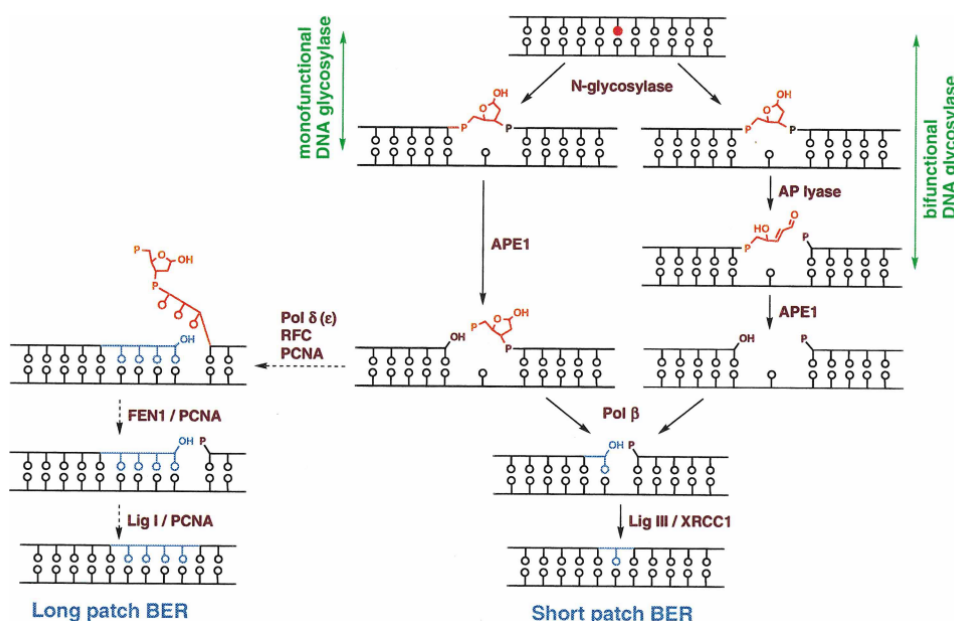


Figure 19 : Système de réparation par excision de bases (Ide and Kotera, 2004).

Cette voie de réparation débute par l'action d'une des ADN glycosylases qui reconnaît la base endommagée puis l'excise en hydrolysant la liaison N-glycosydique, ce qui engendre un site abasique. Certaines de ces glycosylases sont bi-fonctionnelles et ont donc également une activité d'AP lyase. Elles coupent donc la liaison entre le sucre et le phosphate 3'. Sinon cette coupure est réalisée par l'AP endonucléase (APE1). La polymérase β clive le résidu en 5' et introduit le nucléotide adéquat. La ligase III aidée de XRCC1 assure enfin la ligation finale. Lors du mécanisme "long patch repair", après l'action de APE1, les polymérases δ et ϵ ajoutent de 2 à 7 nucléotides. L'endonucléase FEN1 excise ensuite l'ancien fragment de nucléotide et la ligase I assure la ligation finale.

Les cassures simple brin ne nécessitent pas de prise en charge des bases endommagées, elles sont reconnues par une polymérase (PARP) puis l'intégrité du brin

d'ADN est restaurée selon les dernières étapes du mécanisme du BER énoncé ci-dessus. Dans le cas des dommages induits par les rayonnements ionisants et/ou les agents de chimiothérapie, la voie "short-patch" du BER paraît être la plus impliquée. A l'inverse du système MMR, le traitement des dommages issus des agents de chimiothérapie ou des rayonnements ionisants par le BER mène parfois à la résistance à ces traitements.

Il est à noter que les SSB, intermédiaires de la voie de réparation, si elles ne sont pas rapidement et efficacement traitées, peuvent en présence de cluster de dommages ou de fourche de réplication, conduire à la formation de DSB avec des conséquences létales pour la cellule.

- **Réparation par Excision de Nucléotides (NER)**

Le système de Réparation par Excision de Nucléotides (NER), comme son nom le laisse penser, intervient en excisant des nucléotides. Il prend en charge les lésions volumineuses monocaténares (adduits, pontages) qui induisent une distorsion de l'ADN. Ce système de réparation suit le même schéma que le BER : reconnaissance du dommage, incision d'un fragment d'ADN contenant le nucléotide lésé, resynthèse du brin excisé et enfin ligation du brin d'ADN (Scharer, 2003).

- **Réparation des cassures double brin**

Les cassures double-brins sont principalement prises en charge par deux systèmes, la recombinaison homologue (HR) et la réparation par suture des extrémités (NHEJ). Cette dernière consiste à relier les extrémités des 2 brins d'ADN, entraînant souvent le gain ou la perte de quelques nucléotides, ce qui en fait une source potentielle d'erreur.

La recombinaison homologue est quant à elle un mécanisme fidèle, basée sur un échange de séquences entre l'ADN endommagé et un ADN homologue intact (autre chromatide ou autre chromosome de la paire selon la phase du cycle).

Ces systèmes de réparation peuvent être à l'origine des phénomènes de radio et chimiorésistances.

IV.D. Résistance aux agents de chimiothérapie

Une des difficultés importantes dans le développement de la chimiothérapie comme traitement pour les gliomes est le phénomène de résistance rencontré lors de l'utilisation de nombreux composés. En effet, pour la majeure partie des composés proposés, les tumeurs

répondent initialement à la chimiothérapie, mais cette réponse tend à être courte et l'impact sur la survie est faible. Aujourd'hui la faible efficacité de cette thérapie est attribuée principalement à la résistance des cellules tumorales cérébrales. *In vitro*, des cellules mammifères ont notamment montrées une résistance à plusieurs composés structurellement différents. Ce phénomène pléiotropique⁹ est aujourd'hui communément appelé résistance multiple aux xénobiotiques (Multi Drug Resistance, MDR). La résistance peut donc être multiple (MDR) ou individuelle (spécifique à une drogue ou une classe de drogue, IDR), mais aussi innée ou acquise selon qu'elle soit observée dès la première utilisation du composé ou bien qu'elle apparaisse au cours du traitement.

Afin d'appréhender l'enjeu des phénomènes de résistances dans la thérapie des gliomes quelques-uns sont présentés ici *via* des exemples relatifs aux composés présentés ci-dessus (Bredel, 2001).

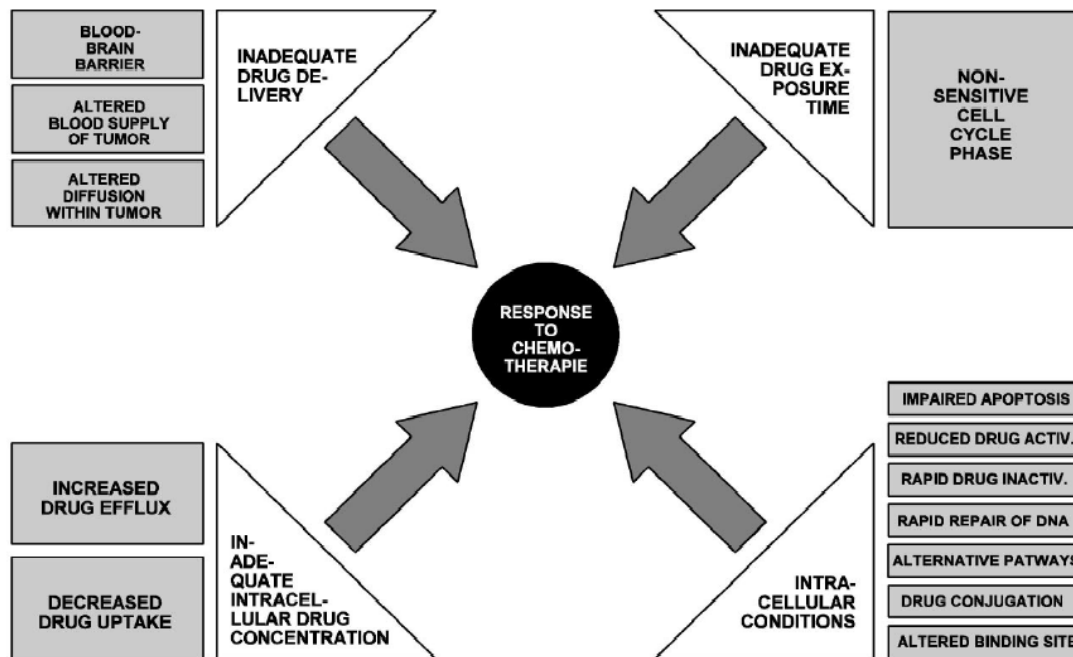


Figure 20 : De nombreux facteurs peuvent être à l'origine de l'échec de la réponse des tumeurs cérébrales à la chimiothérapie (Bredel, 2001).

Comme on peut le voir sur ce schéma, la résistance des tumeurs cérébrales est particulièrement complexe et implique des mécanismes multiples (Bredel, 2001). Ils peuvent inclure notamment, une diminution de l'accumulation intracellulaire de l'agent actif (efflux trop important, entrée trop faible), une inactivation de la drogue (glutathion,

⁹ Pléiotropie : faculté pour un gène d'affecter plusieurs caractères.

métallothionéines), une réparation de l'ADN augmentée, un accès diminué à la cible, une tolérance aux lésions, une capacité diminuée à engager l'apoptose, etc...

- ***Influx/Efflux de la drogue***

La résistance a notamment pour origine l'expression massive des protéines de transport appartenant à la famille ABC ("ATP-binding cassette") comme la P-glycoprotéine. Ce mécanisme de détoxification des cellules par transport actif est présent dans toutes les cellules mais est souvent surexprimé dans les cellules tumorales. L'activité plus importante des protéines d'efflux/influx induit donc la diminution de la quantité intracellulaire d'anticancéreux. Ces transporteurs transmembranaires fixent l'ATP, l'hydrolysent en ADP et utilisent l'énergie produite pour exclure/inclure les agents chimiothérapeutiques de la cellule maligne. Ces protéines membranaires sont peu spécifiques, elles excluent des molécules structurellement très différentes. Elles ont notamment une activité importante au niveau de la BHE pour prévenir l'entrée de métabolites toxiques dans le cerveau à travers les cellules endothéliales. Les mécanismes cellulaires régulateurs qui mènent à une expression importante des P-glycoprotéines dans les tumeurs cérébrales restent incompris. Alors que les glycoprotéines agissent par des mécanismes bidirectionnels en gérant l'entrée et la sortie des composés, la protéine MRP (multidrug resistance-associated protein), qui appartient également à la famille des ABC, n'influe que sur l'efflux des composés. Des données récentes suggèrent que cette protéine expulse de la cellule les xénobiotiques après leurs fixations sur le glutathion. L'expression des transporteurs de Cu responsables notamment de la circulation du cisplatine peut également induire la résistance des cellules aux composés platinés.

- ***Détoxification par le glutathion***

Le glutathion et le système d'enzyme associé est un système de détoxification efficace qui joue un rôle important dans la protection des cellules aux dommages induits par les radicaux libres. L'association des drogues anticancéreuses avec le glutathion mène à un conjugué moins toxique et plus soluble dans l'eau. Ce composé fait partie du système MDR et son activité dans la chimiorésistance a été proposée pour divers composés tels que les composés platinés, les nitroso-urées solubles dans l'eau, les moutardes azotées et le cyclophosphamide. Le glutathion et l'enzyme associée sont présents dans les tissus cérébraux sains mais leur expression se révèle être plus élevée dans les tissus cérébraux cancéreux (Bredel and Zentner, 2002).

- **Métallothionéines**

Les métallothionéines sont une autre voie de détoxification de la cellule. Ces protéines de faibles poids moléculaires contiennent 20 résidus cystéines capables de se conjuguer avec des métaux lourds. Ces protéines inactivent les composés platinés en chélatant le platine *via* ses résidus soufrés. Ces protéines sont présentes dans des tissus tumoraux cérébraux d'histologie variables, notamment pour les astrocytes pour lesquels une expression croissante avec le grade a été observée. Des études contradictoires ne permettent pas pour le moment de relier de façon directe l'expression des métallothionéines avec le devenir des patients (Bredel and Zentner, 2002).

- **Topoisomérase II**

Les mécanismes de résistance présentés jusque là avaient lieu dans le cytoplasme, la topoisomérase intervient, elle, au sein même du noyau et de l'ADN. Certaines formes de topoisomérase II modifient la structure de l'ADN en y introduisant des supertours négatifs affectant ainsi l'accessibilité des séquences d'ADN aux drogues tels que le cisplatine et la carmustine. De même façon que pour les métallothionéines, l'expression de ces enzymes n'a pas pu être corrélée avec la réponse des patients aux traitements (Bredel and Zentner, 2002).

- **Protéines kinase C**

La famille des protéines kinase est vaste et parmi les 3 classes majeures, la classe dite atypique (aPKC) est surexprimée dans les gliomes de haut grade. Trois rôles peuvent leur être attribués dans la résistance à la chimiothérapie des tumeurs cérébrales. Tout d'abord, elles sont impliquées dans le cycle cellulaire et peuvent induire un arrêt en phase G2 du cycle permettant ainsi la réparation des dommages chimio-induits de l'ADN avant la mitose. D'autre part, leur expression dérégulée est un facteur affectant négativement l'induction de l'apoptose. Enfin la PKC régule elle-même la résistance puisqu'elle affecte directement l'expression et l'état de phosphorylation des différentes protéines impliquées dans la résistance : P-glycoprotéine, topoisomérase II, glutathion, MGMT, MRP et métallothionéines (Bredel and Zentner, 2002; Sarkaria *et al.*, 2008).

Plusieurs de ces mécanismes ont été décrits comme étant impliqués dans la résistance au cisplatine, comme représenté sur la Figure 21. Il est possible qu'un seul de ces mécanismes

mène à la résistance au cisPt, mais il paraît plus probable qu'une combinaison de ces mécanismes induise la résistance des tumeurs au cisPt.

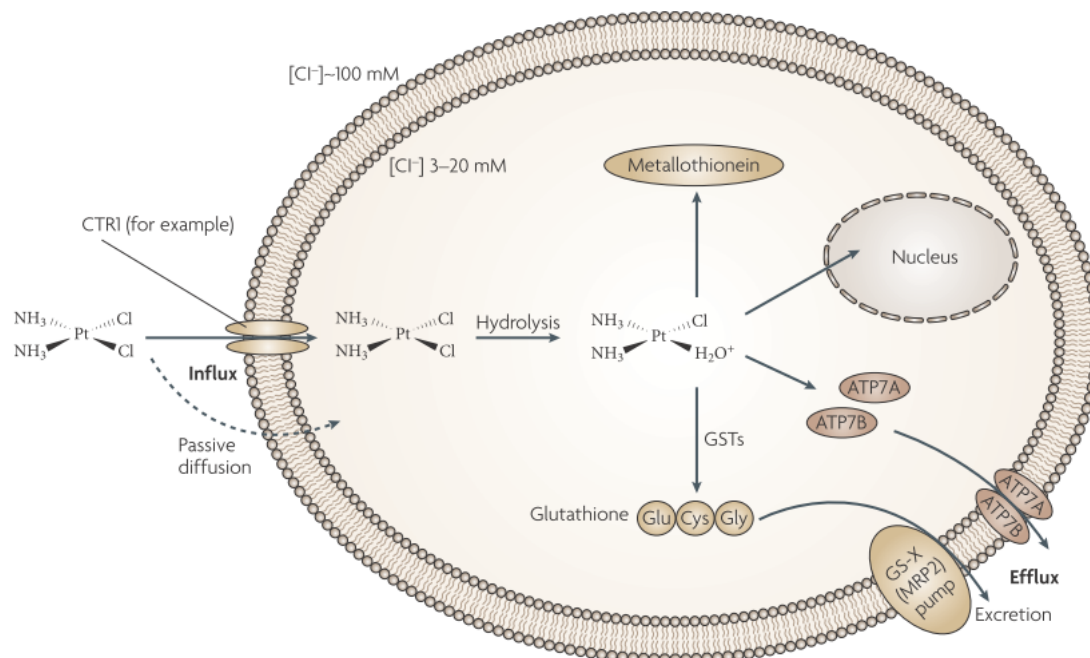


Figure 21 : Résistance tumorale au cisplatine et carboplatine induite par une moindre quantité d'agent platiné atteignant l'ADN (Kelland, 2007).

En parallèle au système MDR, la résistance à un agent unique ou une classe d'agent qui partage des structures similaires (IDR), est souvent la conséquence d'une expression particulière des systèmes de réparation de l'ADN. La contribution à la résistance de la MGMT, ainsi que celle des autres systèmes de réparation sont présentés.

- **Systèmes de réparation**

Comme on l'a vu précédemment la MGMT répare les produits d'alkylation en position O⁶ de la guanine, qui sont notamment produits par le témozolomide et les nitroso-urées. La MGMT a donc un rôle protecteur, et il a été rapporté que dans les cellules résistantes la réparation des adduits O⁶-alkylguanine est augmentée. Il n'y a pas de résistance croisée avec le cisplatine et les moutardes azotées, puisque cette voie de résistance est spécifique de l'alkylation de la position 6 de la guanine (Aida and Bodell, 1987; Bodell *et al.*, 1988; Dolan and Pegg, 1997).

Pour présenter les mécanismes de résistance relatifs aux autres systèmes de réparation, les mécanismes de résistance au cisplatine vont être décrits.

Tout d'abord, les protéines HMG (high mobility group) sont des protéines qui modulent la structure de la chromatine et qui vont, elles, protéger les adduits du cisplatine. Elles reconnaissent en effet les pontages intra-brins du cisplatine avec l'ADN et leurs liaisons aux adduits bloquent les différents systèmes de réparation, (synthèse translésionnelle, NER) mais aussi la réplication et la transcription de l'ADN. Ces protéines en prévenant toute réparation, permettent une sensibilité des cellules au cisplatine.

Le NER est le premier système de réparation des adduits platinés. Tous les pontages intra-brins sont reconnus par le NER mais les pontages entre 2 guanines adjacentes sont réparés de façon moins efficace, ce sont ces lésions qui sont cytotoxiques. Un niveau élevé d'expression de plusieurs gènes du NER a été corrélé avec la résistance au cisPt (notamment XPA et ERCC1).

Si ces lésions ne sont pas réparées par le NER et persistent jusqu'à la réplication, elles sont alors prises en charge par les protéines du MMR. Le système MMR de par sa déficience peut induire une résistance à la mort cellulaire induite par le cisplatine (et de façon générale par les agents méthylants de type SN₁). Ces observations font suite à des études *in vitro* et les mécanismes impliqués seraient un arrêt du cycle cellulaire en G2 et l'induction de l'apoptose ou l'autophagie. En effet, ce système remplace la base opposée à celle modifiée, le dommage reste donc en place, et après un grand nombre répété de cycles dits « futiles », un blocage de la fourche de réplication est observé, ce qui déclenche l'arrêt du cycle cellulaire (Jiricny, 2006; Kinsella, 2009).

Dans certaines lignées cellulaires, la tolérance au platine peut être surmontée sans le recours aux réparations de l'ADN. C'est le rôle de la synthèse translésionnelle et plus particulièrement des polymérases β , η et ζ . La surexpression de la polymérase β , intervenant dans ce mécanisme, mène à la résistance au cisplatine, alors que sa régulation négative induit la sensibilité au cisplatine (Rabik and Dolan, 2007).

IV.E. Marqueurs moléculaires de la réponse à la thérapie proposée

Les réponses aux traitements dépendent de nombreux facteurs, pharmacocinétiques mais aussi de la biologie de la tumeur : chimiosensibilité ou chimiorésistance. La compréhension grandissante des systèmes de résistance à la chimiothérapie pourrait permettre

d'aller vers une analyse prédictive de l'efficacité des traitements proposés. Un aspect prédictif de la réponse aux traitements de chimiothérapie se développe avec le travail de plusieurs équipes. Pour exemple, l'étude réalisée par l'équipe de Herman et coll. a permis de corréler l'inactivation de la MGMT par la mutation du gène correspondant (causée par une hyperméthylation du promoteur de la MGMT), avec une réponse positive des glioblastomes aux agents alkylants tels que le témozolomide (Esteller, 2000; Hegi *et al.*, 2005).

D'autre part, la codélétion des chromosomes 1p et 19q est une altération génomique précoce observée dans les oligodendrogliomes. Cette codélétion est associée à une meilleure sensibilité des tumeurs aux traitements, que ce soit à la radiothérapie ou à la chimiothérapie. Néanmoins des questions se posent encore sur le bien-fondé de ce marqueur, notamment concernant la détection de ces codélétions qui ne permet pas toujours la distinction des pertes partielles ou totales (Ducray, 2008; McDonald *et al.*, 2005).

Enfin le dernier marqueur moléculaire récent de chimiosensibilité des gliomes utilisé en clinique porte sur les mutations du gène IDH1 (isocitrate déshydrogénase I). Les mutations de ce gène affectent la majeure partie des gliomes de grade II et III ainsi que les glioblastomes secondaires. Les gliomes avec des mutations d'IDH1 sont cliniquement et génétiquement distincts des gliomes avec le gène sauvage. En effet très souvent aucune autre altération génétique détectable précocement dans la progression des gliomes n'est détectée et ceci laisse penser que cette mutation se produirait tôt dans le développement tumoral. Enfin, la médiane de survie des patients porteurs de glioblastomes avec des mutations IDH1 ou IDH2 atteint 31 mois, ce qui est significativement plus long que les 15 mois des patients sans mutations IDH1. De même, ces mutations sont également associées avec une amélioration considérable de la survie des patients atteints d'astrocytomes anaplasiques car elle est portée à 65 mois contre 20 mois pour les patients sans mutations (Parsons *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009).

Ces trois marqueurs sont d'ores et déjà utilisés afin de prédire la réponse des gliomes à la chimiothérapie et leurs évolutions (Ohgaki and Kleihues, 2009).

La radiothérapie a donc connu une évolution importante avec notamment des développements pour mieux définir la géométrie d'irradiation. Mais elle est toujours limitée par la dose absorbée par les tissus sains. Une technique dite de radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron a été développée et sera décrite ici. Avant d'aborder cette nouvelle voie de thérapie des notions indispensables telles que les processus physiques mis en jeu lors de différents types de rayonnements ionisants vont être explicitées.

V. Notions sur les rayonnements ionisants

V.A. Rayonnements ionisants, définitions et natures

Un rayonnement ionisant, par définition est un rayonnement qui va induire une ionisation de la matière irradiée, c'est-à-dire que l'atome ou molécule traversé va se charger par l'ajout ou le retrait d'une charge.

Ces rayonnements sont d'origine et de natures différentes. Ils peuvent provenir de particules α ou β , ou bien de photons. Les particules α et β sont émises lors de la désintégration des noyaux radioactifs. Le photon est la particule associée à une onde électromagnétique. La nature électromagnétique des photons, qu'ils soient X ou γ est identique, c'est par leurs origines que ces différents types de photons se distinguent. Le photon γ provient de la désintégration radioactive du noyau (lorsque le noyau passe d'un état excité à un état moins excité). Pour exemple, voici le processus d'émission de photons γ lors de la désintégration du Cobalt 60.

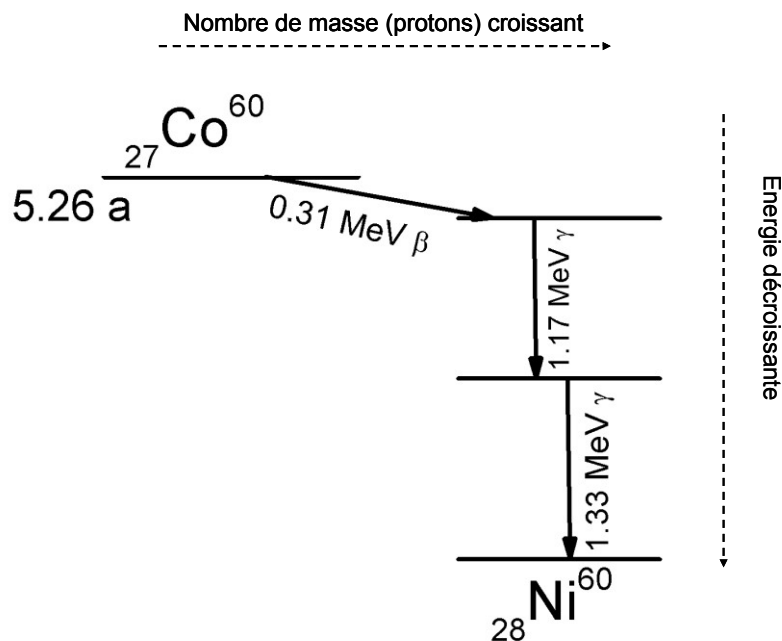
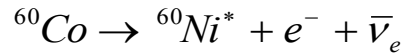
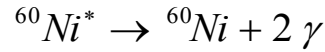


Figure 22 : Schéma de désintégration du ^{60}Co .

Le cobalt 60 se transforme en nickel 60* (donc avec un noyau excité) par une désintégration bêta :



Puis le nickel 60 retombe à l'état fondamental en émettant deux photons gamma :



Les énergies du rayonnement γ produit par une source de Cobalt 60 sont donc de 1,17 et 1,33 MeV (Figure 22).

Concernant les photons X, deux voies différentes peuvent être à leurs origines : soit lors de transitions électroniques, soit lors du freinage ou de changement de direction de particules chargées (principalement des électrons). C'est par ce dernier mécanisme que sont produits les rayons X d'un tube à rayons X ou d'un synchrotron. L'énergie des photons émis varie de quelques eV à quelques centaines de keV.

V.B. Interactions photons-matière

Les interactions entre les photons et la matière cible sont de plusieurs natures, l'effet Compton, l'effet photoélectrique et la production de paires sont les principaux mécanismes observés (Seibert and Boone, 2005).

- **Effet Compton**

Lors de l'effet Compton, le photon incident éjecte un électron libre, dont l'énergie de liaison est négligeable devant celle du photon. Le photon est dévié de sa trajectoire.

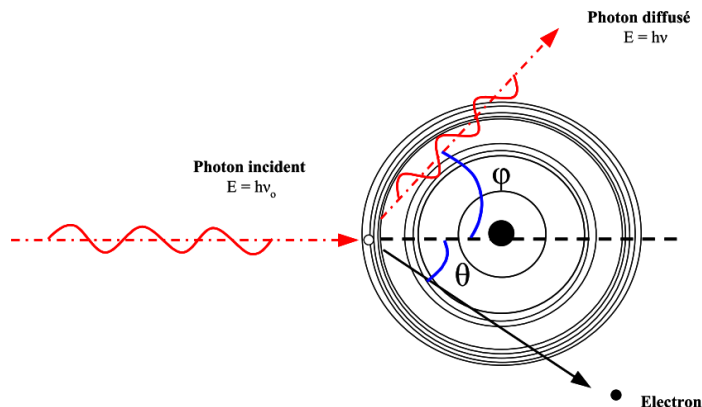


Figure 23 : Effet Compton.

- **Effet photoélectrique**

Le photon incident éjecte un électron, appelé photoélectron d'une couche interne de l'atome. La lacune électronique résultante est comblée par un électron d'un niveau d'énergie supérieure. L'atome est dans un état excité. L'excès d'énergie est libéré par 2 processus différents soit par l'émission de photons de fluorescence, soit par l'émission d'électrons Auger. Suite au départ d'un électron Auger, une nouvelle lacune électronique est créée qui est alors comblée de la même façon que précédemment. La répétition de ce phénomène est alors appelée une cascade d'électrons Auger.

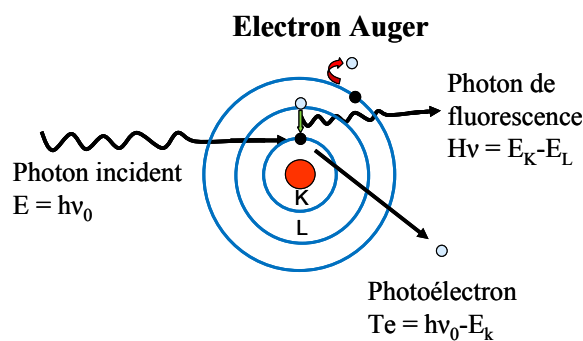


Figure 24 : Effet photoélectrique et réarrangement du cortège électronique.

- **Production de paires**

Le champ électrique intense qui entoure le noyau peut provoquer la transformation d'un photon en un électron et un positon, ce phénomène est connu sous le nom de production de paires.

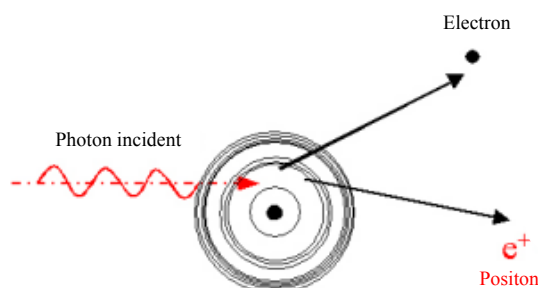


Figure 25 : Production de paires.

La prévalence de ces interactions dépend de l'énergie des photons et de la nature de la matière.

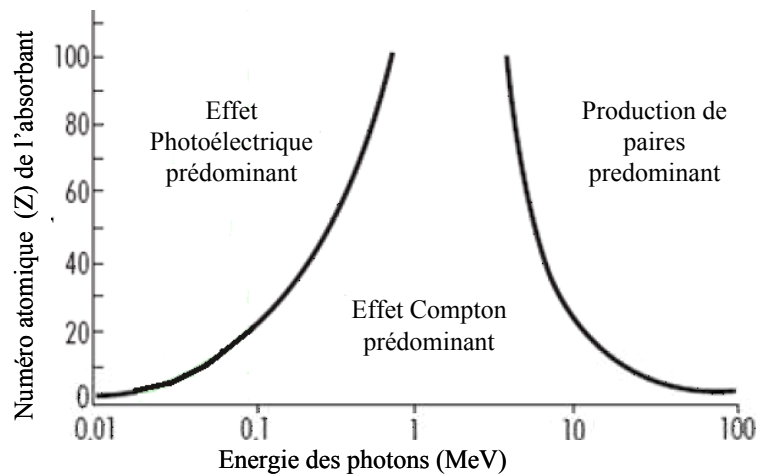


Figure 26 : Zones de prédominance des interactions en fonction de l'énergie des photons et du numéro atomique de l'élément. Les lignes d'isoprobabilités d'apparition des effets sont représentées.

On peut noter que l'effet photoélectrique est prédominant pour des atomes de numéro atomique élevé et pour des rayonnements de basses énergies. Cet événement physique constitue le principe même de la radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron.

VI. Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT)

Le concept de cette technique particulière de radiothérapie, est basé sur la différenciation de l'impact du rayonnement sur les tissus, suite à la présence ou non d'atomes lourds. Une augmentation de l'effet du rayonnement photonique par la présence d'atomes lourds dans le milieu traversé est le principe même de la photoactivation.

VI.A. Prémices de la photoactivation

L'effet délétère d'un rayonnement de basse énergie en combinaison avec des atomes lourds et l'évocation de son utilisation en radiothérapie ont été mis en avant lors de techniques d'imagerie impliquant un agent de contraste iodé et l'utilisation de rayons X de basses énergies. En effet, Norman et Adams ont remarqué lors d'angiocardigraphie, technique qui

combine un agent de contraste (renografin 76) iodé et des rayons X de 65 kVp¹⁰, des dommages chromosomiques (micronoyaux) dans les lymphocytes des patients (Adams *et al.*, 1977; Norman *et al.*, 1978). Les deux hypothèses proposées alors, sont d'une part une dose plus importante délivrée aux lymphocytes en présence d'atomes lourds, attribué à l'effet photoélectrique et d'autre part une induction des aberrations chromosomiques par l'agent iodé lui-même. Même si une toxicité intrinsèque à certains agents de contraste iodés à haute concentration a été observée, aux concentrations usuelles, seul l'effet photoélectrique entre en jeu dans le phénomène observé.

Les travaux de Dawson en 1988 ont en effet souligné qu'aucun effet de l'agent de contraste n'est observé pour les cellules irradiées avec une source de Cobalt, tandis que la cytotoxicité est accrue par une irradiation à 250 kVp (Dawson *et al.*, 1988). La sensibilité des cellules au rayonnement de basses énergies croît avec la concentration d'iode dans le milieu cellulaire. Ces données ont confirmé que l'effet photoélectrique est à l'origine de cette sensibilité au rayonnement par l'iode. Ces résultats ont naturellement conduit plusieurs équipes à adapter ce concept à la radiothérapie, l'idée étant d'augmenter la dose absorbée par la tumeur, en chargeant la tumeur d'iode avant l'exposition aux rayons X.

VI.B. Potentiel de la photoactivation pour la thérapie anticancéreuse

Santos Mello et collaborateurs, ont réalisé un premier essai de thérapie sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées. L'injection d'hypaque (agent de contraste iodé) précède chacune des 10 fractions de 2 Gy à 100 kVp. Une des observations de cette étude est que l'hypaque seul n'a aucun effet évident sur les tumeurs. Une seconde information est que l'iode reste en concentration assez élevée au sein du volume tumoral pendant 30 à 40 minutes, mais qu'aucune trace n'est observée à 24h après l'injection d'iode sur 3 ou 4 sites autour de la tumeur. La conclusion principale de ce travail est que l'irradiation en présence d'iode permet une régression complète de la tumeur chez 80% des souris et partielle pour 15% des animaux tandis que l'irradiation seule permet seulement une régression partielle chez 10% des animaux (Santos Mello *et al.*, 1983).

¹⁰ kVp : tension de polarisation, correspond à un spectre d'énergie allant jusqu'à 65 keV.

VI.B.1 Optimisation de la distribution de dose

Une autre partie de ce travail porte sur la comparaison de la distribution de dose calculée pour une irradiation conventionnelle de radiothérapie (source Co, 1,25 MeV) et une irradiation à 60 keV avec la présence de 4 mg/ml d'iode dans la tumeur. L'irradiation à 60 keV est possible suite à la modification d'un scanner appelé alors CTRx (computed tomography radiotherapy X). Le scanner est converti de sorte que l'imagerie soit encore possible après l'adaptation pour la thérapie. L'intérêt d'utiliser un scanner plutôt qu'un tube à rayons X est de pouvoir centrer l'irradiation sur la tumeur et de la réaliser en mode tomographique (archthérapie sur 360°). Les rendements en profondeur avec les 2 irradiations sont présentés sur la Figure 27.

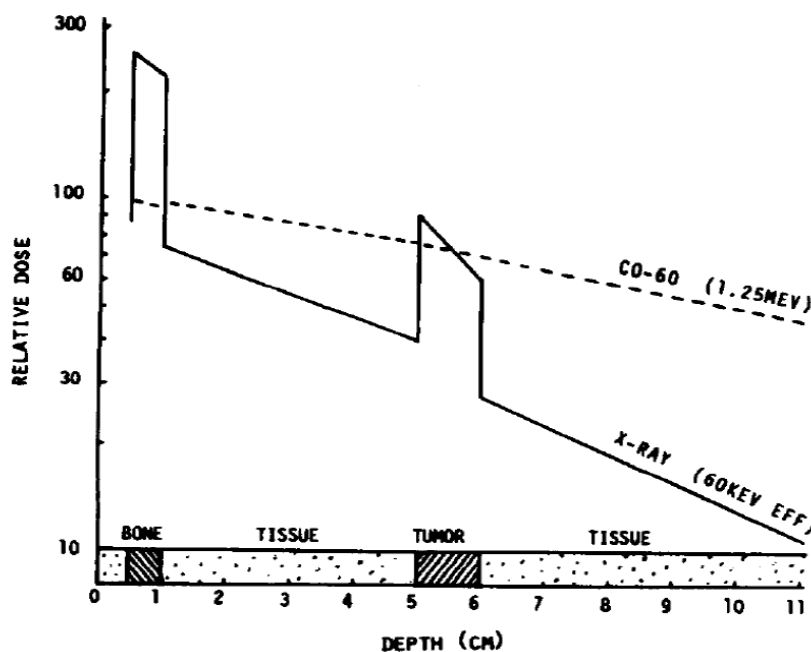


Figure 27 : Rendement en profondeur calculé dans un cerveau, obtenu pour une irradiation à 60 keV avec une tumeur perfusée avec 4 mg/ml d'iode en comparaison avec le profil obtenu pour une irradiation à 1,25 MeV (Santos Mello *et al.*, 1983).

On peut observer que la dose déposée dans la tumeur est similaire dans les 2 cas, mais que les tissus sains en aval et en amont de la tumeur reçoivent moins de dose pour la combinaison de l'irradiation de basses énergies et de l'iode. Enfin, il faut remarquer que pour le traitement aux basses énergies la dose absorbée par l'os est plus importante (Santos Mello *et al.*, 1983).

Cette limitation peut néanmoins être compensée par une irradiation avec plusieurs arcs comme présenté dans les travaux de Mesa. Sur les Figure 28 et Figure 29 sont présentées les

distributions de dose calculées pour une irradiation CTRx à 140 kVp avec un et 3 arcs coplanaires (Figure 28c), la tumeur est alors chargée avec 10 mg/ml d'iode et pour une irradiation stéréotaxique à 10 MeV.

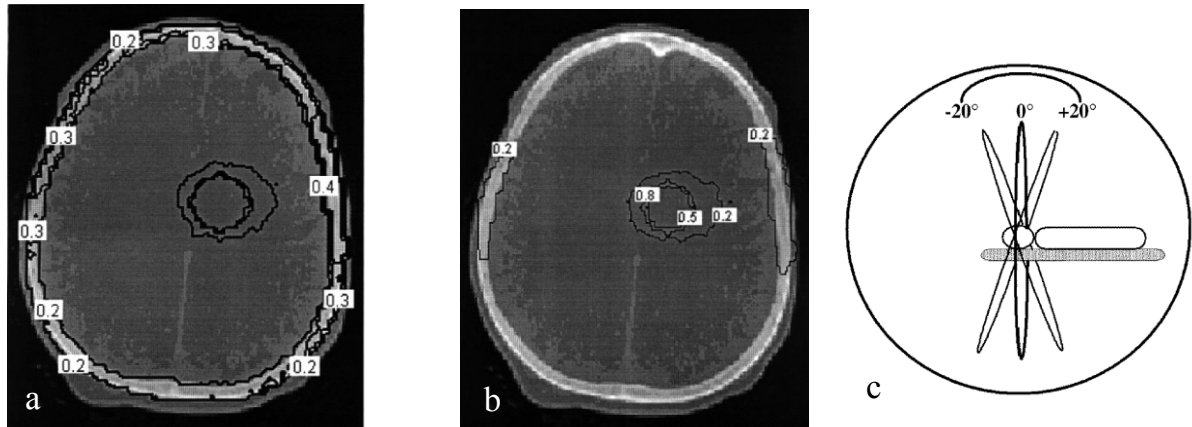


Figure 28 : Distribution de dose calculée pour une irradiation CT avec un arc (a) et avec 3 arcs (b) Vue de profil du CT scanner représentant les 3 axes coplanaires désaxés de 20 degrés (c) (Mesa *et al.*, 1999).

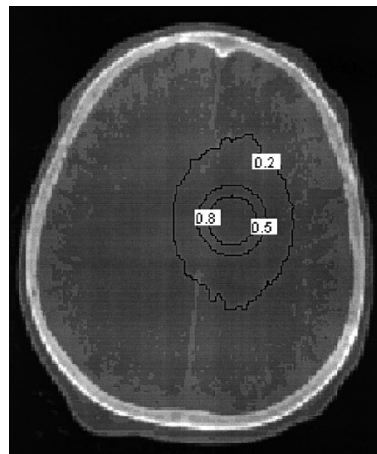


Figure 29 : Distribution de dose calculée pour une irradiation stéréotaxique à 10 MeV (Mesa *et al.*, 1999).

Sur la Figure 28a, on observe que la dose à l'os, est importante pour une irradiation de basses énergies avec un arc et diminue quand l'irradiation est prescrite avec 3 arcs séparées de 20° (Figure 28b). Si la concentration en iode est suffisante (10 mg/ml) et que 3 arcs sont utilisés (Figure 28b), le gradient de dose autour de la tumeur est plus favorable qu'avec une irradiation conventionnelle (Figure 29) puisque les isodoses se resserrent autour de la tumeur (Mesa *et al.*, 1999).

VI.B.2 Thérapie des tumeurs cérébrales

En 1987, Iwamoto et coll. ont expérimenté cette thérapie pour le traitement des tumeurs cérébrales. Le modèle utilisé est une tumeur cérébrale (carcinome) implantée dans le cerveau de lapin. Une irradiation de 15 Gy à 120 kVp en 3 fractions, précédées par une injection d'agent de contraste iodé permet une augmentation de la survie des animaux de 51% par rapport aux lapins traités avec une irradiation seule. Aucune toxicité rénale n'a été observée dans cette étude (Iwamoto *et al.*, 1987). En 1997, Norman et collaborateurs, ont publié une autre étude qui met en avant l'efficacité d'une irradiation à 140 kVp avec un CTRx sur des tumeurs préalablement perfusées par un composé iodé. Cette étude réalisée sur des tumeurs cérébrales (principalement méningiomes et astrocytomes) spontanées de chiens permet en effet d'observer une augmentation de la médiane de survie des animaux par rapport aux animaux sans traitement, comparable à celle obtenue avec une dose équivalente provenant d'une source de ^{60}Co ou d'un accélérateur conventionnel (Norman *et al.*, 1997). Ces travaux rapportent également que cette technique est sans risque puisque aucun dommage en dehors du volume tumoral (y compris sur l'os et la peau), n'est relevé dans les rapports d'autopsie.

VI.C. Premier essai clinique

Le premier essai clinique réalisé par Rose et ses collaborateurs aux Etats-Unis a porté sur le traitement de métastases du cerveau avec pour contrôle une métastase qui ne reçoit pas tout le traitement basses énergies. Le traitement est constitué d'une irradiation totale du cerveau à 6 MV (40 Gy) et d'un boost de 25 Gy (fractions de 5 Gy) centré sur la tumeur après perfusion de celle-ci avec un agent iodé grâce à un CTRx. La première conclusion est l'absence d'effet secondaire (nécrose de la peau, de l'os). 2 des 8 patients traités présentent une diminution du volume de la tumeur traitée alors que le volume de la tumeur contrôle était stable ou augmentait. La perfusion avec l'agent iodé (jusqu'à 5 mg/ml) entraîne une augmentation de l'effet thérapeutique par rapport aux tissus cérébraux sains avec le DEF le plus important de 1,64. Ces résultats s'avèrent être très encourageants pour d'autres essais cliniques (Rose et al., 1999).

Objectifs

Le gliome est une tumeur maligne pour laquelle aucun traitement curatif ne peut aujourd'hui être proposé. Les traitements mis en œuvre allient le plus souvent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La limitation principale de la radiothérapie est liée aux effets secondaires engendrés sur les tissus sains, ceux du cerveau étant particulièrement sensibles.

La SSRT en augmentant l'effet du rayonnement de façon locale et contrôlée, suite à la perfusion de la zone tumorale avec des atomes lourds, permet de protéger les tissus sains. L'objectif de cette thèse est d'évaluer le potentiel de photoactivation de plusieurs composés contenant des atomes lourds, *in vitro* dans un premier temps, puis d'évaluer leur efficacité thérapeutique par des essais précliniques.

Ce manuscrit débutera avec une explication sommaire des différentes techniques expérimentales mises en œuvre lors de cette thèse.

Les résultats feront l'objet de trois chapitres distincts, consacrés à chaque atome lourd employé. La première étude porte sur l'optimisation de la meilleure combinaison radio-chimio-thérapeutique obtenue à ce jour sur le modèle F98, qui combine le carboplatine et l'irradiation synchrotron. Pour démontrer que l'efficacité thérapeutique de ce traitement n'est pas liée au processus d'augmentation de dose induite par l'interaction de rayonnement X de basse énergie sur les atomes de platine, nous avons évalué l'efficacité de la radiothérapie conventionnelle en combinaison avec des injections prolongées de carboplatine. Les dommages de l'ADN inhérents aux agents platinés seront ensuite quantifiés. Dans la suite du développement de composés contenant des atomes lourds au sein de l'ADN, le PtTC un agent platiné est ensuite évalué comme agent photoactivant.

L'IUdR est un autre agent s'incorporant dans l'ADN, qui est connu depuis longtemps pour ses qualités de radiosensibilisation. La radiosensibilisation et la photoactivation de l'IUdR sur le modèle F98 seront estimés *in vitro*, en comparant les effets des rayonnements de hautes et basses énergies. Les effets, à l'échelle de l'ADN, de la radiosensibilisation de ce composé et d'un agent de contraste iodé feront l'objet du chapitre suivant.

La photoactivation des nanoparticules d'or a finalement été évaluée sur des cellules de gliome en culture puis lors d'essais précliniques sur des rats porteurs de gliomes. Des études complémentaires d'imagerie et de microscopie ont permis d'obtenir des résultats préliminaires sur la quantification et la localisation des nanoparticules d'or d'un point de vue macroscopique et microscopique.

Pour finir, les principaux résultats obtenus sont résumés, l'intérêt de chaque composé utilisé lors de ce travail est discuté et les perspectives de développement de ces travaux de recherche seront proposées.

Techniques expérimentales

Ce chapitre présente les techniques utilisées lors de ce travail. Tout d'abord, l'installation européenne de rayonnement synchrotron et plus particulièrement la ligne de lumière ID17 est présentée et expliquée. Puis les autres dispositifs d'irradiation et d'imagerie seront décrits succinctement que ce soit pour les cellules ou pour les animaux. Ensuite les essais précliniques ainsi que la survie cellulaire permettant d'évaluer l'efficacité de la thérapie proposée, seront exposés. Enfin, les moyens de détection et de quantification des dommages de l'ADN seront décrits.

I. Techniques d'irradiation et d'imagerie

I.A. Installation et Rayonnement synchrotron

L'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) est une installation européenne basée à Grenoble. Le rayonnement synchrotron, jadis considéré comme une émission secondaire parasite responsable d'une grande perte d'énergie des électrons est aujourd'hui un outil recherché par de nombreux scientifiques d'horizons divers.

Cette installation (Figure 30) est composée d'un accélérateur linéaire (LINAC), qui permet d'accélérer les électrons émis par un canon à électrons, jusqu'à une énergie de 200 MeV. Ensuite ces électrons pénètrent dans un accélérateur circulaire appelé booster, afin d'être là encore accélérés pour atteindre une énergie de 6 GeV. Enfin, ils sont injectés dans l'anneau de stockage de 840 m de circonférence où ils circulent dans le vide à une vitesse proche de celle de la lumière et sont maintenus à énergie constante.

L'anneau de stockage n'est pas parfaitement circulaire il est en fait constitué d'une succession de sections rectilignes et de parties courbes. A la jonction entre deux sections rectilignes, un aimant de courbures est placé qui génère un champ magnétique orienté perpendiculairement à la trajectoire des électrons. Ce champ force les électrons à suivre une trajectoire courbe et les aligne dans l'axe du segment suivant.

Or d'après les équations de Maxwell, toute particule chargée dont la vitesse varie, en valeur absolue ou en direction, émet un rayonnement électromagnétique. Lorsque l'on considère des électrons relativistes et lorsque la déviation de trajectoire est produite par des structures magnétiques particulières (aimants de courbures, wigglers ou onduleurs), on parle de rayonnement synchrotron. L'émission de rayonnement se fait tangentiellement à la

trajectoire des électrons, et le spectre continu s'étend de l'infrarouge aux X durs avec une très grande intensité.

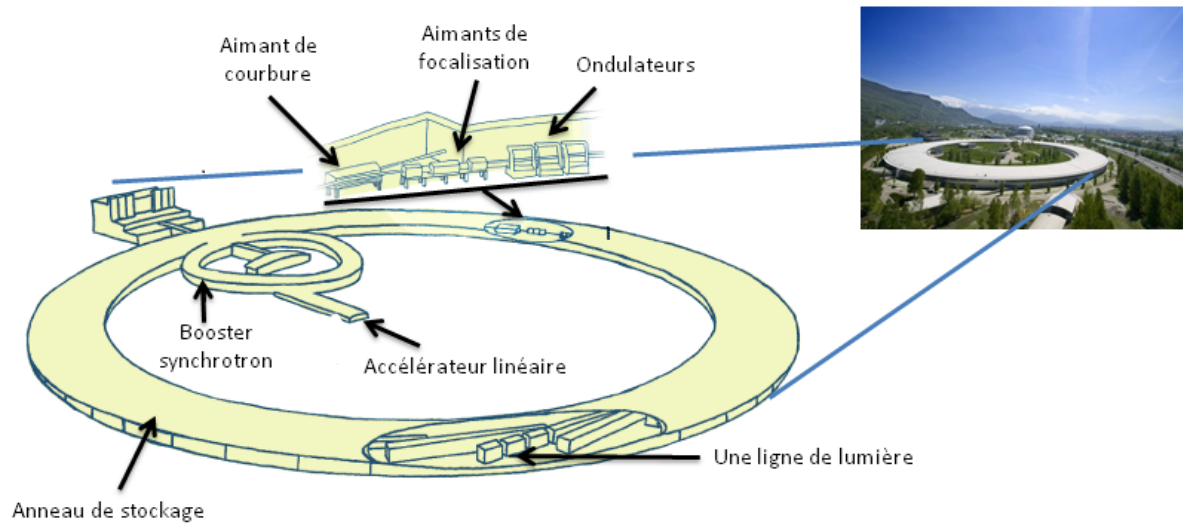


Figure 30 : Composants du synchrotron de Grenoble.

Le rayonnement synchrotron permet de dépasser certaines limites des sources de rayons X conventionnelles. Comme illustré sur la Figure 31, ce rayonnement présente une très grande intensité de photons, qui est supérieure de cinq ordres de grandeur à celle fournie par un tube à rayons X et couvre un large spectre en énergie. Cet important flux de photons permet de sélectionner une énergie grâce à l'utilisation de monochromateurs, tout en conservant une intensité considérable, suffisante pour l'imagerie médicale ou la radiothérapie.

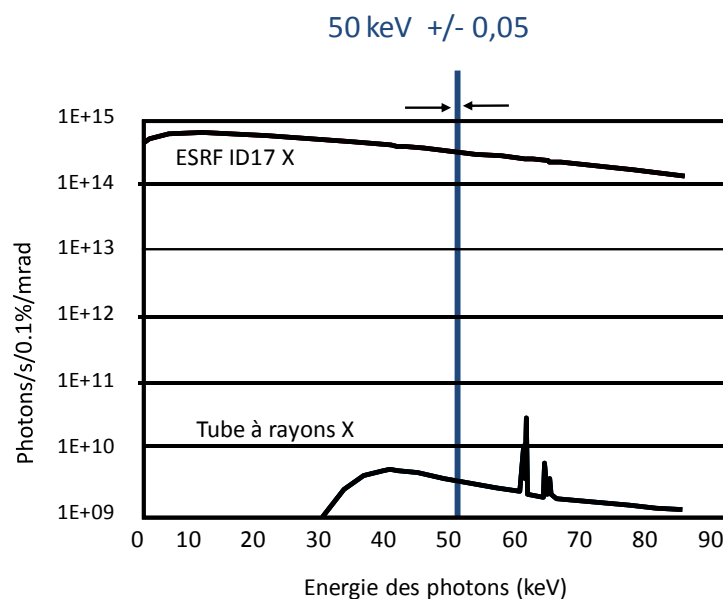


Figure 31 : Comparaison des spectres issus du wiggler d'ID17 et d'un tube à rayon X classique.

Sur la ligne de lumière ID17, l'énergie de faisceau disponible va de 30 keV à 90 keV environ. Le monochromateur permet de sélectionner une énergie de photons avec une précision qui est fonction de l'énergie sélectionnée, et qui à 50 keV est de l'ordre de 50 eV.

La largeur du faisceau est modulable jusqu'à 15 cm, tandis que la hauteur est fixée à 1 mm pour les énergies utilisées. Des plaques de tungstène placées en sortie du monochromateur permettent d'ajuster finement les dimensions du faisceau. Le détecteur positionné au fond de la salle expérimentale (après l'échantillon) est un détecteur germanium haute pureté utilisé pour l'imagerie et la dosimétrie. Ce détecteur est monté sur un système de translation afin de l'aligner avec le faisceau.

I.B. Irradiation et imagerie monochromatique stéréotaxique

Une chambre d'ionisation PTW est utilisée pour calibrer le faisceau. Elle est calibrée dans l'air et positionnée à l'endroit du sujet irradié. Le débit de dose dans l'eau est calculé d'après la lecture de l'électromètre auquel est reliée la chambre, et en tenant compte de la température et de la pression.

- ***Dispositif d'irradiation des solutions cellulaires***

Les cellules sont irradiées dans des cryotubes de 2 ml positionnés à l'horizontal et en rotation sur l'axe horizontal pendant l'irradiation (Figure 32) afin d'éviter la sédimentation des cellules au fond du tube et donc d'assurer une exposition au rayonnement uniforme. Ensuite le faisceau est ajusté à la largeur du tube (environ 2 cm). La hauteur du faisceau étant fixé à 1 mm, le tube est balayé en hauteur à une vitesse maximale de 50 cm/s. Le débit de dose est en moyenne de 1 Gy/min.

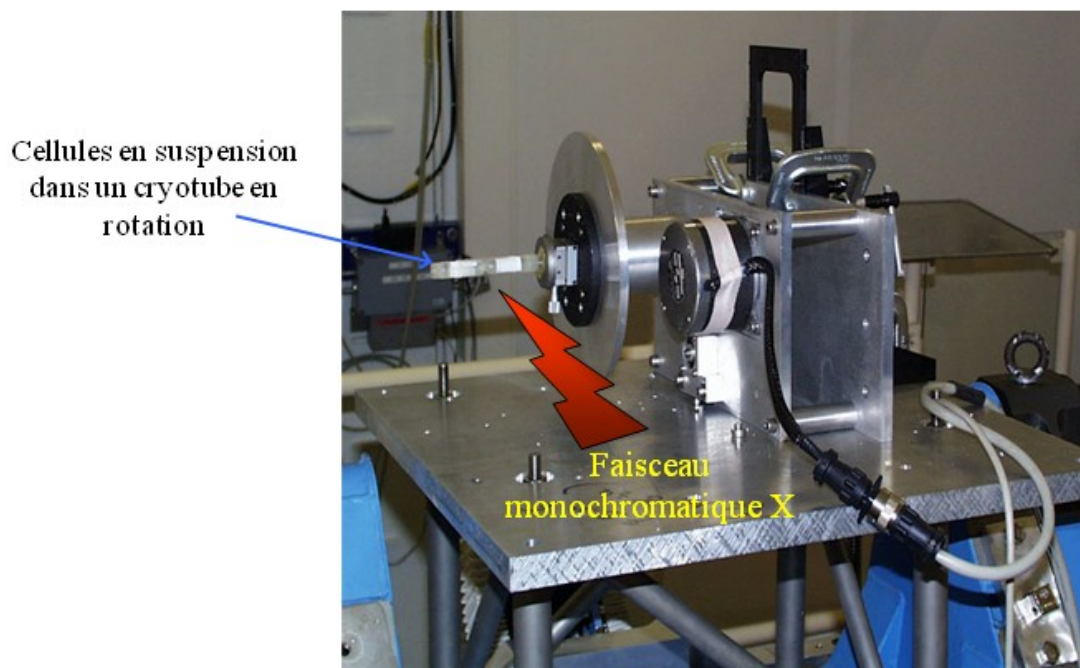


Figure 32 : Dispositif d'irradiation des solutions cellulaires.

La densité cellulaire de la solution est de l'ordre de 200.000 et 500.000 cellules par ml. Pour les cellules irradiées avec l'IUdR les cellules sont irradiées dans l'obscurité. Pour les nanoparticules d'or les cellules sont irradiées dans un contenant de plus petit volume afin de diminuer le volume de solution irradiée car ces composés coûtent chers. Des capillaires en PTFE (polytétrafluoroéthylène) de diamètre interne de 2 mm et diamètre externe de 3 mm sont remplis avec 100 μ l de solution.

- **Dispositif d'imagerie et d'irradiation des animaux**

Que ce soit pour l'imagerie ou pour l'irradiation le rat anesthésié est placé sur un cadre stéréotaxique en plexiglas, ce cadre est ensuite fixé verticalement sur le support de rotation de la plateforme, appelé "chaise" du patient, voir Figure 33. La chaise est en fait une plateforme montée sur des moteurs qui permettent des translations latérales et verticales, mais aussi des mouvements de rotation (Elleaume *et al.*, 1999).

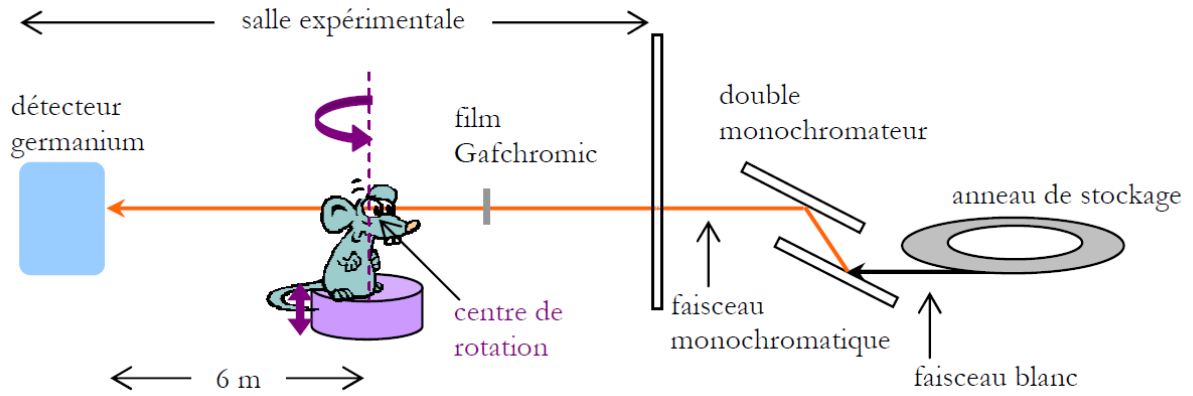


Figure 33 : Dispositif d'irradiation/imagerie en mode tomographique (Rousseau, 2007).

En effet le faisceau étant fixe, c'est donc le sujet à irradier qui bouge. L'irradiation comme l'imagerie sont réalisées en mode tomographique. Ce qui veut dire que l'irradiation se fait par arcs de 360° , le sujet tourne alors sur lui-même. La hauteur du faisceau étant limitée, le sujet est translaté verticalement (de la hauteur d'une coupe) entre chaque rotation de 360° , comme illustré sur la Figure 34. L'axe de rotation est fixé sur le centre de la tumeur.

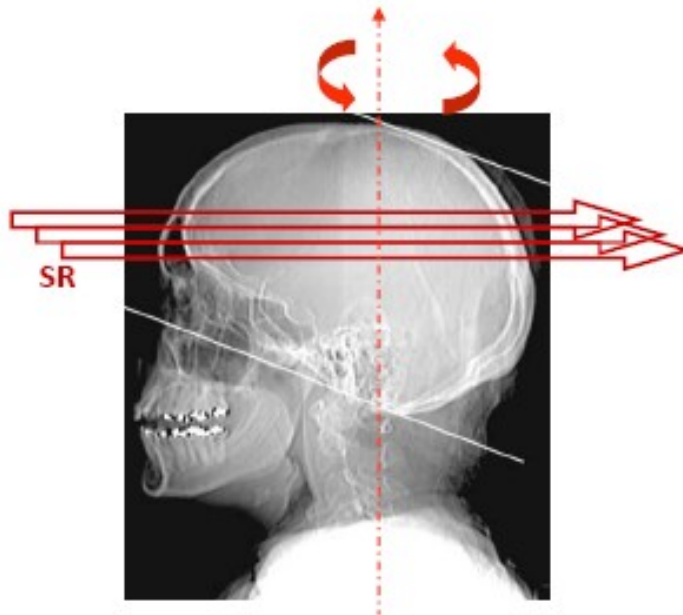


Figure 34 : Irradiation/Imagerie en mode tomographique d'un patient.

- ***Irradiation stéréotaxique***

Une série d'images tomographiques précédant l'irradiation est acquise, couvrant un volume de 1,5 à 2 cm de hauteur (15 à 20 coupes de 1 mm d'épaisseur). Lors de l'acquisition de ces images, on ne peut distinguer la tumeur, puisqu'il n'y a pas eu d'injection d'iode au préalable. C'est en fait la boîte crânienne et les structures anatomiques qui permettent de localiser la zone tumorale, et ceci grâce au fait que les injections de cellules tumorales sont réalisées en coordonnées stéréotaxiques. Ces images permettent de vérifier le bon positionnement du rat sur le cadre, mais aussi de repérer le trou dans l'os du crane percé lors de l'implantation des tumeurs. De cette coupe tomographique, sur laquelle on visualise le trou, on déduit les coordonnées verticales du volume à irradier et on calcule les translations horizontales de la chaise nécessaires pour placer l'axe de rotation sur le centre de la tumeur. L'irradiation se fait en mode tomographique, de la même façon que pour l'imagerie décrite ci-dessous. L'intensité du faisceau est de 200 mA et la dose d'environ 1,5 mGy/s/mA. 11 à 15 coupes, de hauteur de 0,7 à 1 mm d'épaisseur et de 8 à 10 mm de large sont irradiées. Un film GalfChromic (MD-55, International Specialty Products, Wayne, NJ) est placé en amont du rat, afin de vérifier que la dose délivrée est homogène et que les coupes soient bien jointives et non superposées, comme illustré sur la Figure 35.

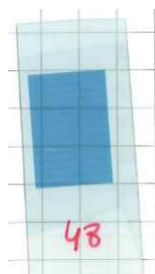


Figure 35 : Film Galfchromic correspondant à l'irradiation d'un rat.

Les différents paramètres d'irradiation (dose délivrée et énergie des photons) seront résumés au début de chaque expérience.

- ***Imagerie tomographique***

L'imagerie est le plus souvent réalisée le lendemain de l'irradiation afin d'éviter la présence d'autres éléments dans le tissu cérébral au moment de l'irradiation. Une imagerie tomographique volumique du cerveau de l'animal est réalisée après l'injection par la veine de la queue d'ioméron, agent de contraste iodé. L'extravasation de l'iode dans la zone tumorale

suite à la perméabilisation de la BHE permet une prise de contraste dans la zone tumorale révélant ainsi la présence de la tumeur. Les images sont acquises à 35 keV afin de maximiser le contraste entre l'iode et les tissus sains et la dose délivrée par l'imagerie est de l'ordre de 10 cGy (dose à la peau). Une série d'images tomographiques est donc acquise pour chaque rat, qui permet de s'assurer de la présence de la tumeur et de définir les coupes correspondantes à la tumeur. Environ 15 coupes de 1 mm de haut permettent de couvrir la zone tumorale, comme on peut en voir un exemple sur la Figure 36, ci-dessous.

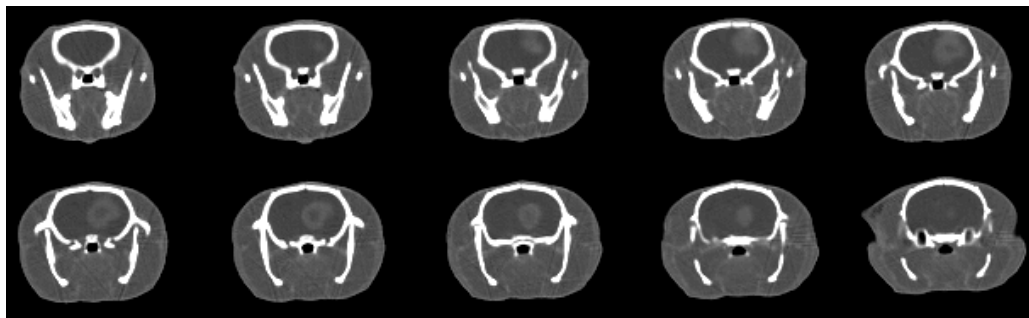


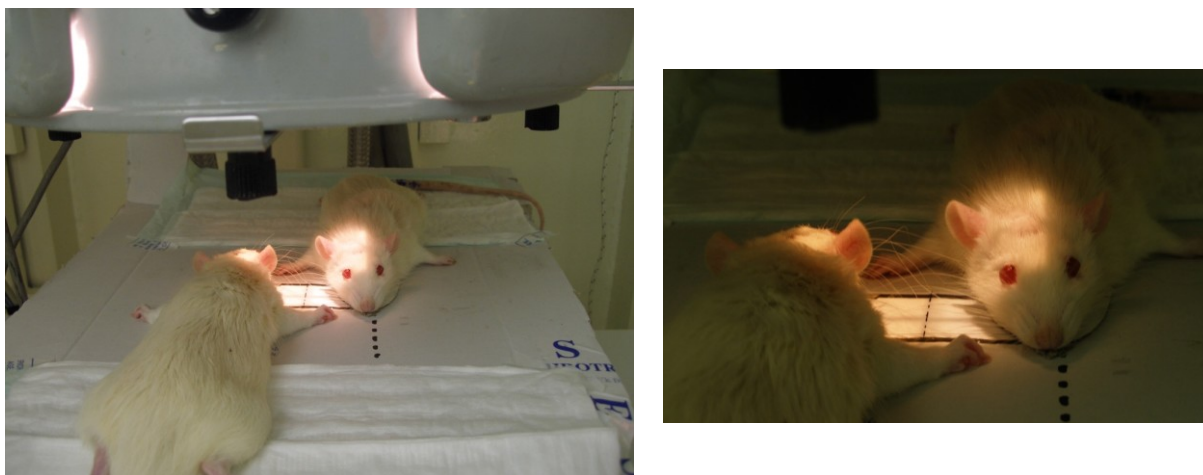
Figure 36 : Images tomographiques d'un rat, obtenues avec le détecteur germanium, après injection d'agents de contraste par la veine de la queue.

D'autre part, lors de la tomographie réalisée juste avant l'irradiation (sans agent de contraste), selon la concentration en atome lourd des composés utilisés, la présence et la localisation des éléments lourds peuvent être visualisées sur les images acquises. La concentration macroscopique de ces composés peut même être évaluée.

I.C. Autres sources d'irradiation et d'imagerie

- **Dispositif d'irradiation des animaux par un générateur de rayons X**

Lors de l'expérience d'irradiation fractionnée, le synchrotron n'étant pas disponible pour des irradiations successives sur plusieurs jours, les irradiations ont été réalisées avec un générateur de rayons X (GeneX). Les rats sont irradiés deux par deux et placés sur le ventre en tête bêche. Un champ lumineux correspondant au champ d'irradiation permet de positionner les hémisphères droits des rats dans ce champ, comme illustré ci-dessous.



**Figure 37 : Positionnement des rats pour l'irradiation avec le Gene X.
Le champ lumineux correspond au champ d'irradiation.**

La tension de polarisation du générateur est réglée à 150 kVp et l'énergie effective est de 50 keV.

- ***Dispositif d'irradiation des cellules par un générateur de rayons X***

Des solutions cellulaires sont également irradiées au GeneX. La tension de polarisation du générateur est réglée à 200 kVp et l'intensité à 20 mA. L'énergie effective avec le filtre de 2 mm d'aluminium est d'environ 70 keV. La dosimétrie est réalisée par Magali Edouard à l'aide d'une chambre à ionisation PTW. Les boîtes de Pétri contenant les cellules en suspension sont placées dans le champ d'irradiation. Le débit de dose est alors de 1 Gy/min à la surface du milieu de culture.

- ***Irradiation des rats avec un irradiateur conventionnel (6MV)***

Les irradiations à hautes énergies sont réalisées au CHU de Grenoble avec un irradiateur médical, accélérateur linéaire de 6 MV (SLI, Elekta, UK). Les rats sont placés sur le ventre et irradiés deux par deux, tête-bêche dans une boîte en polystyrène (Figure 38). La tête de chaque animal est alignée au milieu d'un unique champ de 8 x 4 cm², défini par les collimateurs. Ce positionnement permet d'irradier uniquement l'hémisphère droit de chaque animal. Un bloc de cire, matériau équivalent au tissu à ces énergies, positionné entre les deux têtes, ainsi qu'un bolus équivalent tissus de 0,5 cm placé sur le dessus de la tête des rats permettent d'assurer l'équilibre électronique. La dose calculée (système de traitement de planning : Dosigray, Dosisoft, Cachan, France) à une profondeur de 1,5 cm est délivrée avec un débit de 200 cGy/min.

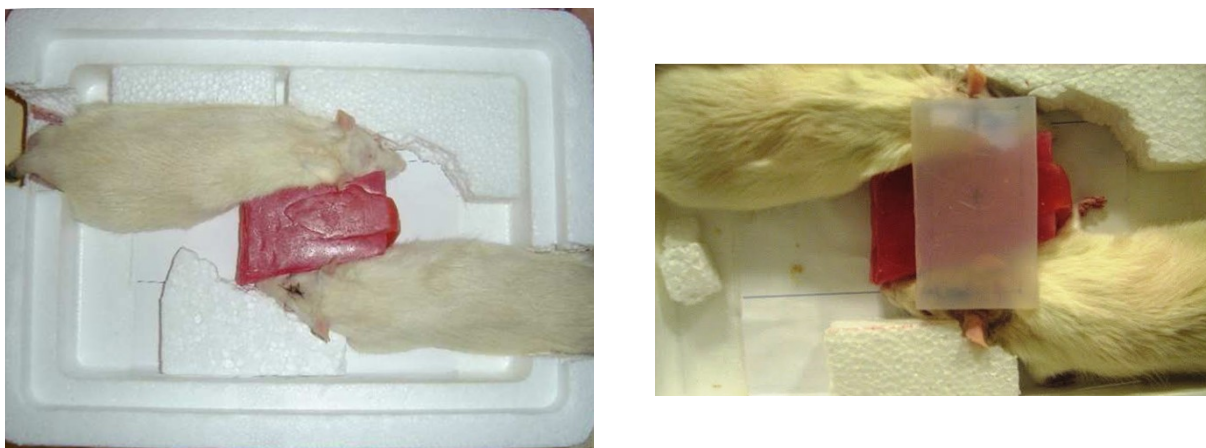


Figure 38 : Dispositif d'irradiation des rats à 6MV.

Après traitement, les rats sont imagés au scanner de l'hôpital pour vérifier la présence de la tumeur et la caractériser en volume, ils sont là encore imagés par deux en tête bêche, comme illustré sur la Figure 39.



Figure 39 : Positionnement des animaux lors de l'imagerie scanner.

- ***Irradiation de cellule avec une source de ^{60}Co***

Afin de comparer la radiosensibilité des composés entre un rayonnement de hautes énergies et le rayonnement synchrotron, des cellules sont irradiées avec une source de cobalt 60. Une telle source est disponible au CEA dans l'équipe Nucléart. Cette source est immergée dans une piscine profonde de 5 mètres. L'échantillon est placé dans un container,

qui est descendu au fond de la piscine. Le débit de dose varie selon la distance entre la source et l'échantillon et à la distance utilisée le débit de dose est de 2 Gy/min.

II. Evaluation de l'effet du rayonnement en présence ou non d'atomes lourds

L'effet des différentes combinaisons de rayonnement et atomes lourds ou agent de chimiothérapie est évalué aussi bien sur des animaux que sur du matériel biologique tel que des cellules ou de l'ADN.

II.A. Etudes précliniques

Pour toutes les expériences réalisées lors de ce travail de thèse, les cellules tumorales (F98) sont implantées par injection intracérébrale dans le noyau caudé des rats. Les coordonnées stéréotaxiques sont prises par rapport au bregma, identifié sur la Figure 40, dans le plan horizontal et par rapport à la surface de l'os dans le plan vertical.

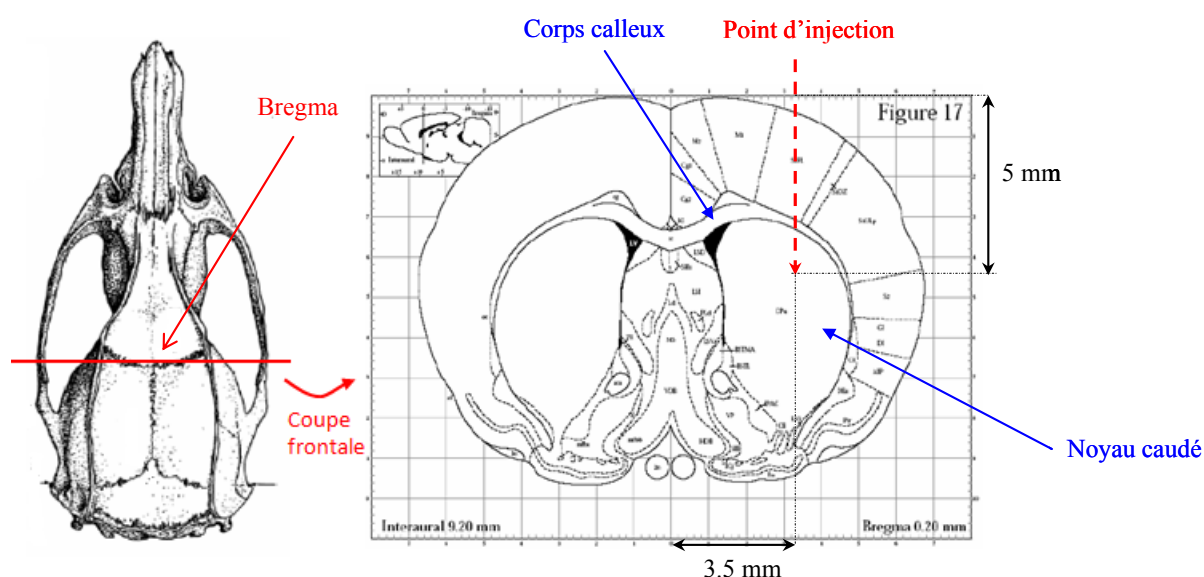


Figure 40 : Coordonnées du point d'injection des cellules tumorales et/ou des composés.

Alors que le repère de 3,5 mm à droite du bregma est une donnée identique à toutes les études, les autres conditions telles que la profondeur de l'injection, le volume et le nombre de cellules injectées seront rapportées pour chaque expérience.

Une imagerie de la tumeur est réalisée, la veille ou le lendemain de l'irradiation afin de s'assurer de la présence de la tumeur. Lorsque le composé radiosensibilisant est injecté en une seule fois, cette injection est réalisée de 10 minutes à 2 heures (selon la cinétique de distribution du composé) avant l'irradiation. Lorsque le composé est infusé en continu pendant 7 jours à l'aide d'une pompe osmotique, celle-ci est posée 6 jours après l'implantation de la tumeur. Enfin la tumeur est irradiée le 14^{ème} jour et le suivi des animaux consiste en une pesée fréquente et une observation régulière de leur état physique et de leur comportement. La combinaison d'une perte de poids importante, ainsi que des signes d'ataxie¹¹ et de chromodacryorrhée¹² abondante sont les signes d'une mort imminente (Yang *et al.*, 1997). Quand ces signes apparaissent les animaux sont euthanasiés par une inhalation d'isoflurane puis par une injection intracardiaque de Doléthal (Vétoquinol, Lure, France).

II.B. Survie cellulaire

Le test de clonogénicité permet d'évaluer la survie cellulaire en déterminant la proportion de cellules capables de produire des colonies après division cellulaire (Franken *et al.*, 2006). Ce test consiste à ensemercer dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture complété avec du sérum de veau et des antibiotiques un nombre défini de cellules. 14 jours après l'ensemencement, les cellules ont formé des colonies qui sont colorées (au crystal violet) et comptées. Le rapport du nombre de colonies comptées par rapport au nombre de cellules ensemencées définit la survie cellulaire pour une condition. Chaque condition est de façon générale répétée 3 fois de sorte que chaque point d'une courbe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Si l'on désire quantifier l'effet de radiosensibilisation d'un agent, on normalise la survie des cellules irradiées en présence de l'agent avec la survie des cellules exposées à l'agent et non irradiées, ceci correspond en fait à la toxicité induite par l'agent lui-même.

Les résultats de ces études de survie cellulaire sont le plus souvent représentés graphiquement par des courbes de survie dont l'ordonnée représente la survie clonogénique (échelle logarithmique) et l'abscisse la dose de rayonnement (échelle linéaire) comme représenté sur la Figure 41.

¹¹ Ataxie : trouble moteur non paralytique caractérisé par une mauvaise coordination des mouvements.

¹² Chromodacryorrhée : sécrétions rouges (au niveau des yeux et du nez) qui sont provoquées par un pigment (la porphyrine) et que l'on confond avec du sang.

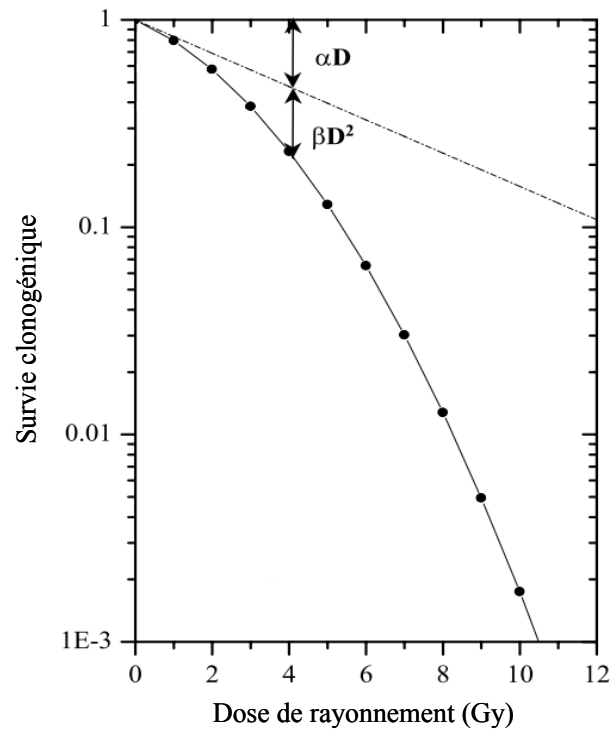


Figure 41 : Illustration d'une courbe de survie cellulaire ajustée avec le modèle linéaire quadratique.

Les courbes sont ajustées avec une fonction linéaire-quadratique grâce au logiciel Origin, modèle utilisé couramment en radiobiologie, dont l'équation est :

$$S = e^{\alpha D - \beta D^2}$$

où S est la survie, D la dose de rayonnement et α et β des paramètres ajustables qui représentent la radiosensibilité. Le paramètre α exprime la contribution des lésions létales d'emblée, c'est-à-dire les dommages non réparables alors que le paramètre β est corrélé aux lésions sub-létales.

Afin d'apporter des informations complémentaires quant à la toxicité de l'effet de radiosensibilisation des agents étudiés, les dommages de l'ADN sont également étudiés.

II.C. Etudes des dommages de l'ADN

La méthode des comètes, qui consiste en une électrophorèse permet la quantification des cassures de l'ADN dans les cellules exposées à un stress.

Les cellules stressées sont incluses dans un gel d'agarose sur une lame de verre, puis les membranes sont lésées par action chimique et enfin la pelote d'ADN fixée dans l'agarose

est exposée à un champ électrophorétique. L'ADN chargé négativement va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse. Pour les noyaux intacts, l'ADN ne migre pas, tandis que l'ADN endommagé migre ce qui conduit à observer une comète, la tête de la comète étant formée par l'ADN intact et la queue formée par l'ADN lésé, étiré par le champ électrique. Ensuite l'ADN est révélé par du BET (bromure d'éthidium, marqueur fluorescent de l'ADN). Les lames sont enfin observées au microscope à fluorescence, on observe alors des "comètes" (voir Figure 42). La quantité d'ADN dans la queue est proportionnelle au nombre de cassures de l'ADN de la cellule considérée.

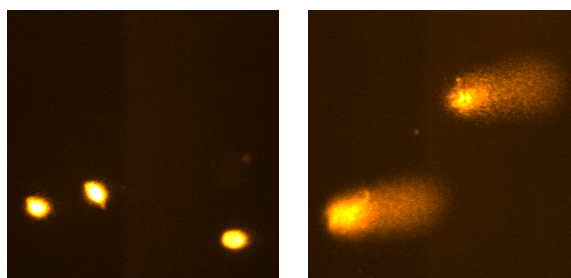


Figure 42 : Photos de cellule en analyse comète.

Cette méthode a permis de quantifier l'effet des agents radiosensibilisants selon la nature des rayonnements.

II.D. Quantification des dommages de l'ADN (HPLC-MS/MS)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) permet de séparer des composés, couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) elle devient une méthode sensible et très spécifique pour la détection et la quantification des lésions de l'ADN.

- **Extraction et digestion de l'ADN**

La présence de dommages de l'ADN tel que l'IUdR et les adduits avec le cisplatine peuvent être détectés et quantifiés dans les cellules exposées par l'approche suivante.

Tout d'abord l'ADN est extrait des cellules par lyse des membranes cytoplasmiques et nucléaires puis après dégradation des ARN et des protéines, l'ADN est précipité. L'ADN ainsi obtenu est ensuite digéré par des enzymes qui vont sectionner l'ADN en nucléosides. On obtient donc un mélange des quatre nucléosides normaux et du (ou des) dommage(s).

- **Quantification des dommages de l'ADN par HPLC-MS/MS**

La première partie de l'appareil est constituée de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) qui permet de séparer les composés en fonction de leur polarité. Elle est composée d'un injecteur (automatique ou non), d'une colonne (thermostatée ou non) et d'un détecteur UV. Une phase stationnaire recouvre l'intérieur de la colonne (dans notre cas, colonne C18, phase apolaire) tandis qu'une phase liquide (dans notre cas, une phase polaire : solution aqueuse contenant des sels) traverse la colonne. Les composés dilués dans la phase liquide pénètrent dans la colonne. Ces derniers ont des temps de rétention différents dépendants de leurs affinités avec la phase stationnaire. Le détecteur UV à la sortie de la colonne permet de détecter et quantifier les nucléosides normaux (qui absorbent en UV à des longueurs d'onde d'absorption maximale comprises entre 260 et 280 nm). Si les dommages de l'ADN étaient produits en grande quantité, l'HPLC seul pourrait permettre de quantifier les dommages de l'ADN (si ceux-ci absorbent en UV).

Or les dommages formés et les échantillons à analyser sont en général en très petites quantités. C'est pourquoi le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse en tandem est indispensable.

La spectrométrie de masse permet de séparer des composées en fonction de leur rapport masse (m)/charge(z). Il existe plusieurs types de spectromètre de masse qui diffèrent par leurs modes d'ionisation et leurs analyseurs. Le spectromètre de masse détaillé ici est composé d'une source électrospray qui assure une ionisation douce (à pression atmosphérique) des composés, on trouve ensuite monté en série un analyseur quadripolaire qui permet de séparer les ions. Enfin un détecteur permet de détecter ces ions. Sur la Figure 43 est représentée la source d'ionisation par électrospray.

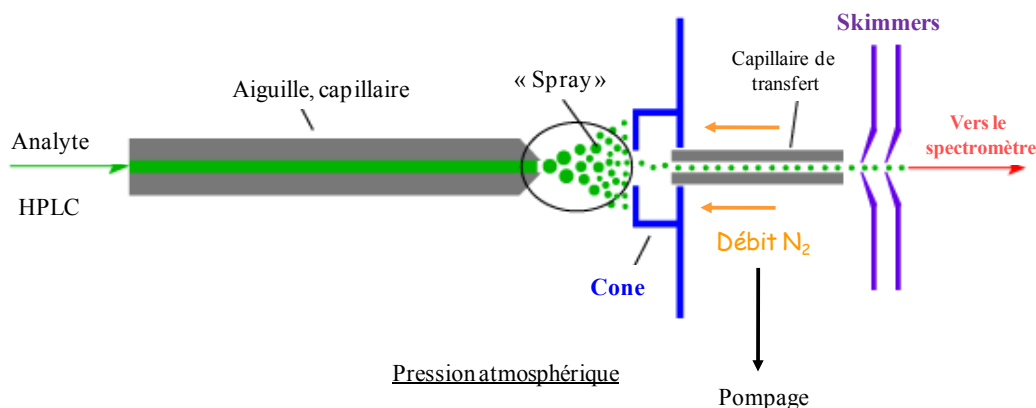


Figure 43 : Ionisation douce par électrospray.

Comme on peut voir sur la Figure 44, les composés arrivent sous forme liquide dans l'aiguille. A la sortie de l'aiguille une haute tension crée un spray électrostatique de gouttelettes multichargées contenant les composés. Un flux d'azote gazeux (gaz de nébulisation) permet l'évaporation du solvant, créant des charges très concentrées, après explosion coulombienne les ions multichargés sont séparés.

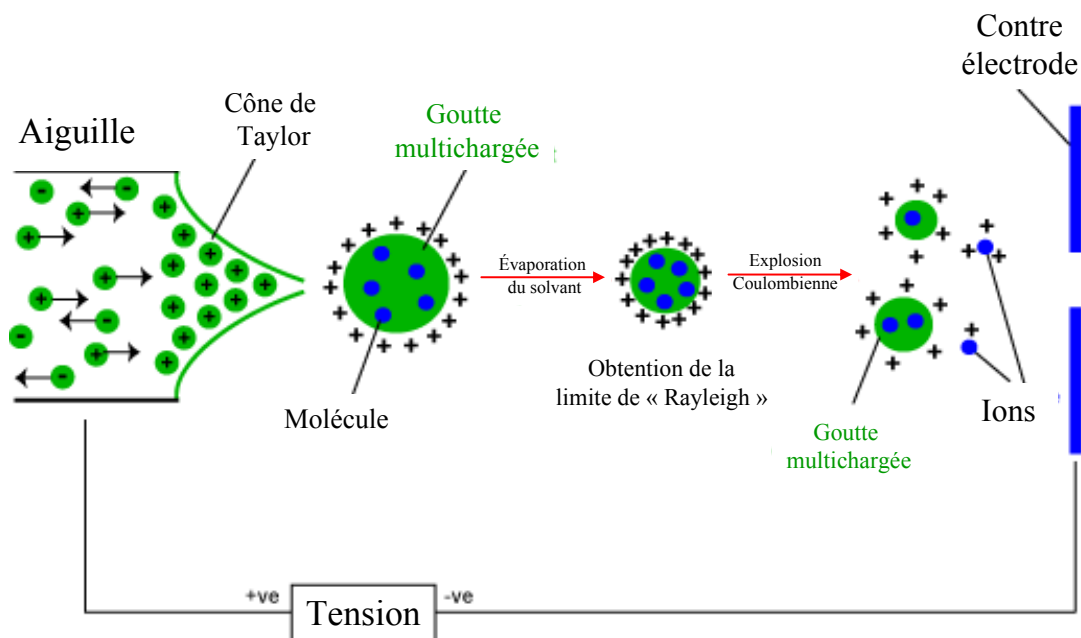


Figure 44 : Formation des ions dans la source d'électrospray.

Ce processus se répète jusqu'à obtenir majoritairement des ions mono-chargés. Ces ions pénètrent ensuite dans le spectromètre de masse dans lequel règne un vide poussé. Cette méthode d'ionisation très douce permet l'ionisation de molécules avec un fractionnement des molécules très faible.

Un quadripôle (Figure 45) est constitué de 4 électrodes soumis à une tension et un champ magnétique, qui permettent de sélectionner les molécules en fonction de leur masse.

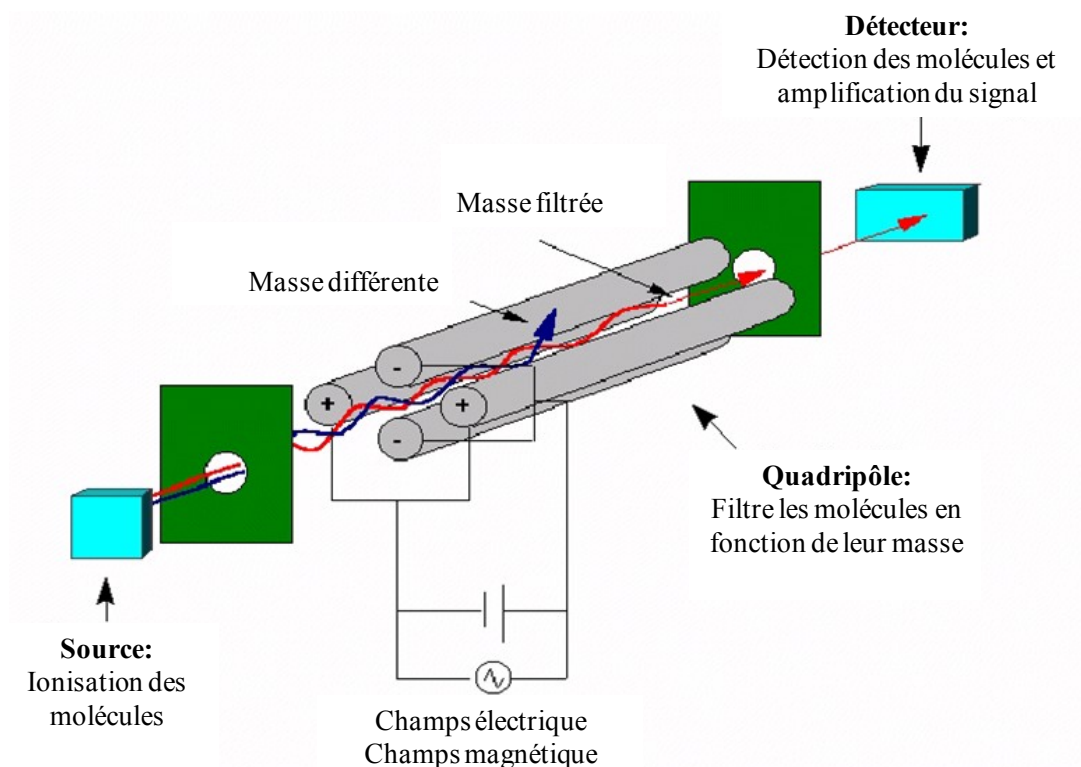


Figure 45 : Analyseur quadripôle.

Un triple quadripôle contient donc 3 quadripôles successifs, le premier quadripôle permet de filtrer les ions d'intérêt qui sont fragmentés dans le second quadripôle, qui sert de cellule de collision et enfin les fragments sont sélectionnés dans le troisième quadripôle.

L'analyseur triple quadripôle permet une détection très spécifique des ions puisque outre la masse de l'ion c'est par ses fragments que la molécule est sélectionnée. Il est peu probable que deux molécules ayant une même masse aient aussi un spectre de fragmentation identique. Enfin l'utilisation d'un standard externe de concentration connue aussi bien pour les nucléosides normaux que pour le dommage étudié permet la quantification des nucléosides normaux et des lésions de l'ADN de l'échantillon analysé. Les résultats sont présentés sous forme d'une quantité de dommages par rapport à un million de nucléosides normaux.

Chapitre 1

Association d'agents de chimiothérapie platinés et de radiothérapie.

Plusieurs études ont évalué l'efficacité du cisplatine et du carboplatine avec la radiothérapie pour le traitement des gliomes. Ici seuls les principaux résultats obtenus sur le modèle F98 seront décrits.

Dès 1983, la publication des résultats obtenus par Kaneko rapporte que l'injection systémique de cisplatine associée à une irradiation induit une augmentation de la médiane de survie des animaux porteurs de gliomes F98 (Kaneko *et al.*, 1983). Des études réalisées par Marie-Claude Biston et Julia Rousseau dans le cadre du développement de la thérapie par renforcement du dépôt de dose ont permis de mettre en avant, via des études précliniques, l'efficacité de l'association de la chimiothérapie injectée en intracérébrale (cisplatine et carboplatine) et de la radiothérapie sur le modèle F98. Parmi les travaux publiés en 2004 par Biston, l'injection intracérébrale en bolus¹³ de 3 µg de cisplatine suivi par une irradiation de 15 Gy à 78 ou 78,8 keV permet d'obtenir les meilleurs résultats avec 36 % des animaux guéris (Biston *et al.*, 2004). Si l'absence de différence entre une irradiation au-dessus et en dessous du seuil K du platine pouvait laisser pressentir que le phénomène de photoactivation n'était pas prédominant dans l'efficacité du traitement, les résultats de Julia Rousseau avec le carboplatine ont permis de le confirmer. L'injection intracérébrale en CED (Degen *et al.*, 2003) de 20 µg de carboplatine associée à un rayonnement de basse énergie (synchrotron) ou à un rayonnement de haute énergie (accélérateur conventionnel) engendre en effet des résultats similaires (Rousseau *et al.*, 2007a). Le même constat a été effectué lors de la comparaison d'une injection intratumorale (CED) de 6 µg de cisplatine combinée à une irradiation de haute ou basse énergie (Rousseau *et al.*, 2010). L'efficacité du traitement paraît donc être attribuée à une association de la chimiotoxicité propre au cisplatine/carboplatine et aux dommages radio-induits.

¹³ Injection manuelle.

I. Chimio-radiothérapie des gliomes par le carboplatine

I.A. Contexte de l'étude

L'évolution des méthodes d'injection (de l'injection en bolus à l'injection en CED) a permis d'homogénéiser les volumes de distribution et d'obtenir de meilleurs résultats en termes de survie. L'utilisation de pompes osmotiques pour infuser le carboplatine de façon prolongée a été proposée par Carson et Wu en 2004 (Wu *et al.*, 2004). L'injection de carboplatine par ces pompes osmotiques a conduit aux meilleurs résultats obtenus à ce jour sur le modèle de gliome F98 dans le cadre de la thèse de Julia Rousseau. Les résultats suite à l'injection continue pendant 6 jours de 72 μg de carboplatine et d'une irradiation de 15 Gy à 78,8 keV sont représentés sur la Figure 46 (Rousseau *et al.*, 2009b).

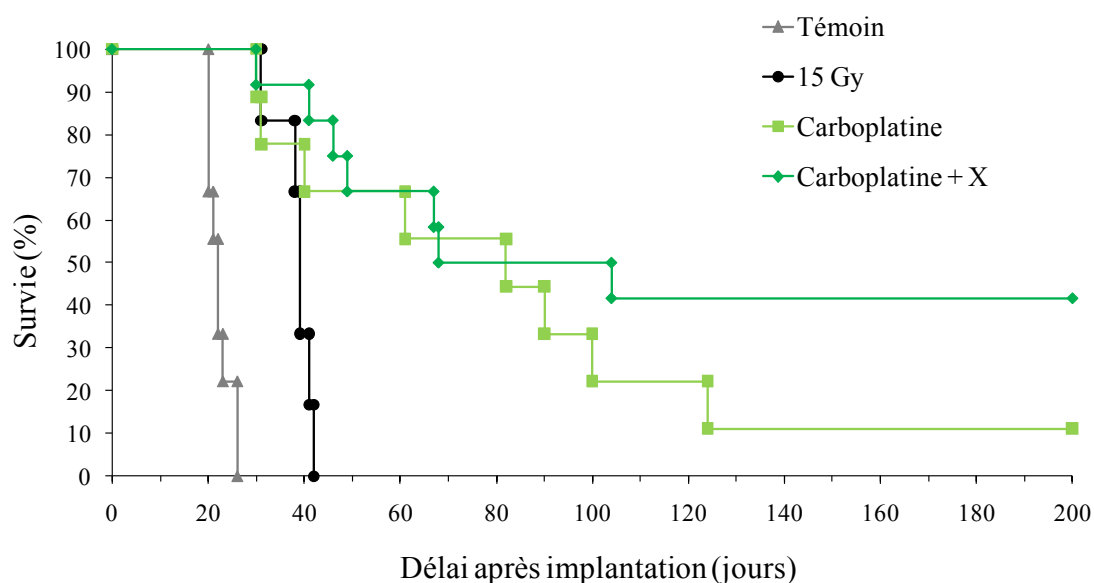


Figure 46 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par une injection intracérébrale continue de carboplatine suivie ou non d'une irradiation de 15 Gy à 78,8 keV. Les temps de survie sont indiqués en jours après l'inoculation de 1000 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est administrée de J7 à J13 par des pompes osmotiques (0,5 mg/ml – 1 $\mu\text{l/h}$) et la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14 (Rousseau *et al.*, 2009b).

On remarque qu'une partie des animaux répond favorablement au traitement et sont guéris tandis que d'autres animaux ne présentent pas d'augmentation de la survie par rapport au bénéfice apporté par la seule irradiation.

Une mauvaise distribution de l'agent pourrait être une explication de la variation de réponse des animaux au traitement. Dans ses travaux, Guarnieri expérimente l'utilisation d'un cathéter souple en remplacement du cathéter rigide de la canule d'injection utilisé habituellement, comme illustré par la Figure 47. Il propose que ce cathéter, en suivant les mouvements de l'encéphale diminue le phénomène de reflux de la drogue le long du cathéter.

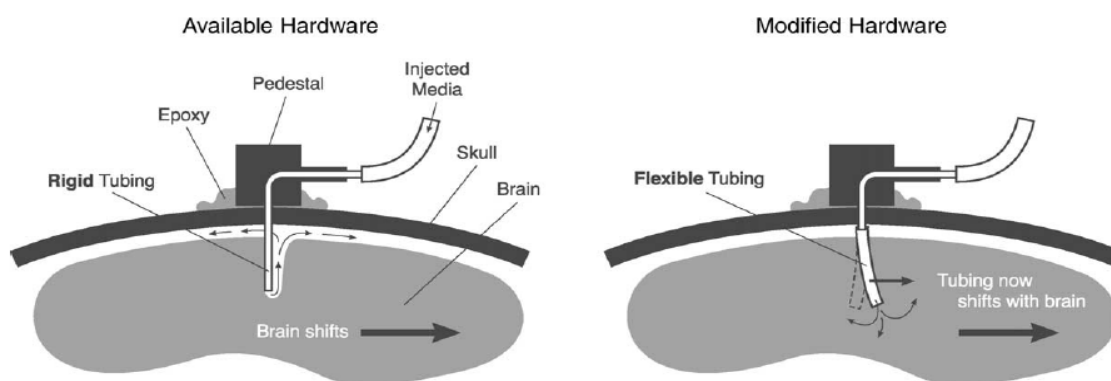


Figure 47 : Mouvement du cathéter dans le cerveau en fonction de sa flexibilité (Guarnieri *et al.*, 2005).

Afin de déterminer si ce nouveau dispositif améliore le profil de distribution d'agents de poids moléculaires différents, la quantification des agents dans plusieurs zones du cerveau à différentes distances du point d'injection a été réalisée par Guarnieri. La spectrométrie d'absorption atomique a permis la détection des atomes de platine tandis qu'un marquage fluorescent permet celle de la doxorubicine, composé de haut poids moléculaire. Les résultats des distributions obtenues aussi bien sur des rats sains que sur des rats porteurs de gliomes F98 ou 9L, sont reportés sur le Tableau 1 et le Tableau 2 correspondants respectivement à l'utilisation de cathéters rigides ou souples.

Group	Treatment	Normal distribution
1	None	5/8
2	F98 tumor	4/8
3	9L tumor	2/8
4	None	2/5
5	None	3/4
6	F98 tumor	9/12

Tableau 1 : Proportion de cerveaux de rats examinés ayant une distribution homogène après l'infusion de carboplatine avec un cathéter rigide (Guarnieri *et al.*, 2005).

Group	Treatment	Assay	Normal distribution
1	F98 tumor	Platinum	6/6
2	9L tumor	Doxorubicin	6/6
3	None	Doxorubicin	6/6
4	9L tumor	TRF-dox	4/4
5	None	TRF-dox	4/4

Tableau 2 : Proportion de cerveaux de rats examinés ayant une distribution homogène après l'infusion de carboplatine avec un cathéter souple (Guarnieri *et al.*, 2005).

Il apparaît clairement dans cette étude que l'utilisation des cathéters souples entraîne une distribution plus homogène de l'agent pour la totalité des animaux tandis que les cathéters rigides ne permettent une distribution correcte que pour la moitié des animaux.

I.B. Modèle tumoral

Il existe différents modèles de gliomes, aucun de ces modèles ne simulant exactement les caractéristiques des gliomes de haut grade humains (glioblastomes ou astrocytomes anaplasiques), le modèle choisi se doit d'être le plus adapté à l'étude réalisée. Le modèle de gliome utilisé dans cette étude, aussi bien pour les études cellulaires que pour l'implantation de tumeurs chez les rats est le modèle F98 de gliome de rat.

Ce modèle tumoral a été obtenu après une injection intraveineuse de N-éthyl-N-nitroso-urée à une rate Fischer gestante au 20^{ième} jour de gestation (Swenberg *et al.*, 1972). Les tumeurs développées par la portée ont été classées à partir de leurs caractéristiques morphologiques et histologiques. Suite à cette caractérisation anatomopathologique, le modèle F98 a été classifié comme un gliome anaplasique ou indifférencié (Ko *et al.*, 1980). Ce modèle F98 grossit de façon invasive et des études histologiques révèlent des foyers microscopiques éloignés de la masse tumorale ainsi que des infiltrations dans la matière blanche. Le centre de la tumeur présente un cœur nécrotique, bordé de cellules tumorales proliférantes, il est donc difficile de délimiter les contours de la masse tumorale et de la matière blanche environnante (Clendenon *et al.*, 1990).

Les tumeurs issues de cellules F98 sont très agressives. L'index mitotique des cellules de gliomes anaplasiques est supérieur à celui des cellules gliales et des cellules de gliomes différenciées (Ko *et al.*, 1980). En effet, une semaine après l'inoculation de 1000 cellules F98 en intracérébral chez des rats Fischer, le gliome croît de façon exponentielle et le volume tumoral 14 jours après l'implantation est estimé à 30 mm³ (Fournier *et al.*, 2003).

Alors que d'autres modèles tels que les gliosarcomes C6 et 9L sont capables de déclencher une réponse spécifique et de régresser spontanément, le modèle F98 se révèle être faiblement immunogène (Barth, 1998). En effet, l'implantation de 10 cellules F98 dans le cerveau entraîne invariablement le décès de l'animal et une augmentation de la médiane de survie peut donc être incontestablement attribuée au traitement. Cette condition paraît essentielle pour évaluer la réponse en termes de survie des gliomes à un traitement sur des rats immunocompétents. Doblas et ses collaborateurs ont confirmé suite à une étude d'imagerie (IRM et angiographie) que les tumeurs issues de cellules F98 sont très invasives et infiltrantes (Doblas *et al.*, 2010). De plus ces travaux nous renseignent également sur la vascularisation de la tumeur, puisqu'il semble que ce type de modèle s'approvisionne auprès des vaisseaux sanguins pré-existants, puisqu'aucun nouveau vaisseau n'est observé et que les vaisseaux au sein de la zone tumorale sont plus longs et plus larges. Enfin, ce modèle est réfractaire à divers traitements tels que l'association des nitroso-urée avec la radiothérapie et la BNCT. Au regard de toutes ces caractéristiques comparables à ceux des gliomes de haut grade humains, le modèle F98 est considéré comme un bon modèle pour des études de survie. Ce même modèle est utilisé tout au long de ce travail de thèse.

I.C. Résultats

Nous avons réalisé, une expérience similaire à celle rapportée par Julia Rousseau mais en utilisant d'autres cathéters plus souples. Nous avons, d'autre part, souhaité évaluer l'efficacité de ce traitement avec un accélérateur linéaire de radiothérapie conventionnelle pour comparaison.

Une semaine après l'implantation des tumeurs, les pompes osmotiques sont posées et délivrent une solution de carboplatine pendant 6 jours. Le lendemain du retrait des pompes, une dose de 15 Gy à 6 MV est délivrée sur l'ensemble de l'hémisphère droit de l'animal. Les conditions expérimentales concernant aussi bien l'implantation des tumeurs que l'injection continue par les pompes osmotiques sont résumées dans le Tableau 3.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ l 1701 SN, 26 sG	0,5 μ l/min	non	4 μ l	1000	7 mm puis 6,5 mm
Carboplatine	pompe osmotique Alzet	1 μ l/h	-	144 μ l	0,5 mg/ml carboplatine	6,5 mm

Tableau 3 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et du carboplatine.

Les résultats obtenus lors de cette étude de survie sont représentés sur la Figure 48 et sur le Tableau 4.

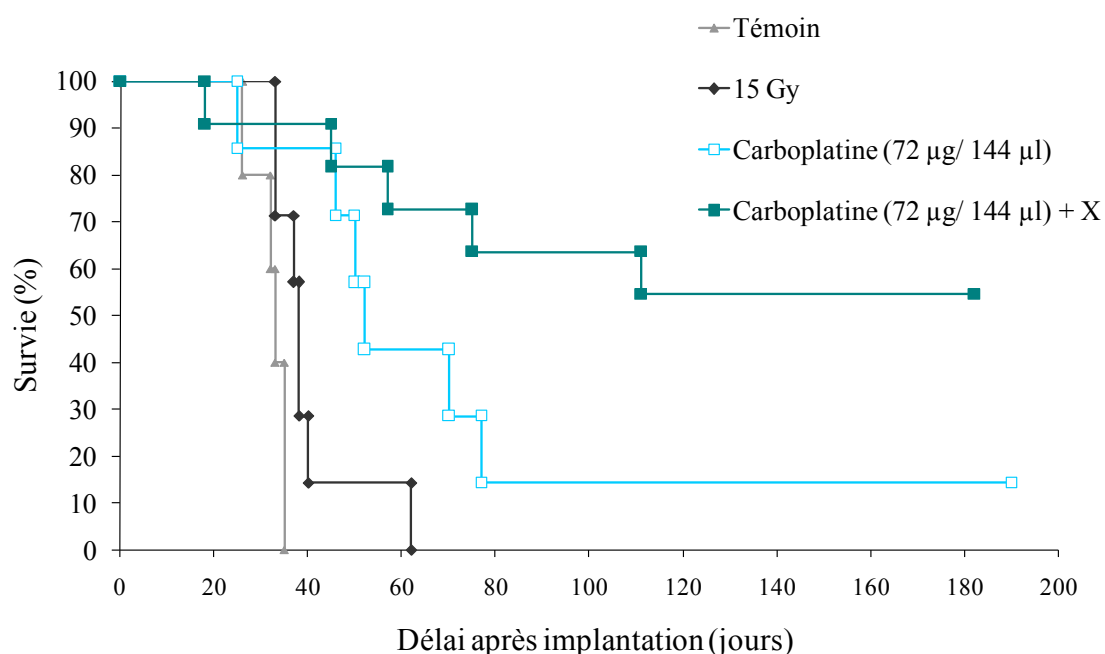


Figure 48 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par une injection intracérébrale continue de carboplatine suivi ou non d'une irradiation de 15 Gy à 6 MV. Les temps de survie sont indiqués en jours après l'inoculation de 1000 cellules F98 (J0). La chimiothérapie est administrée de J7 à J13 par des pompes osmotiques (0,5 mg/ml – 1 μ l/h) et la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14.

Groupe	Survie (en jours)			% ILS	
	intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
témoin	26-35	32,2 \pm 3,7	33	-	-
carboplatine	25-182	72,8 \pm 54,3	52	126,09	57,58
15 Gy	33-62	40,1 \pm 10	38	24,53	15,15
carboplatine + 15 Gy	18-182	127 \pm 67	182	294,41	451,52

Tableau 4 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par du carboplatine et/ou une irradiation de 15 Gy à 6 MV.

La médiane de survie des rats traités par le carboplatine seul est portée à 52 jours et est donc améliorée par rapport à celle des rats témoins de 33 jours. Le traitement complet permet d'observer une survie à long terme de 55 % des animaux. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Julia Rousseau avec un rayonnement synchrotron de 78,8 keV. La nature flexible du cathéter de la canule d'injection ne semble pas avoir améliorée l'efficacité du traitement. Ces résultats confirment que l'énergie du rayonnement employée dans cette association de chimio-radiothérapie n'est pas déterminante. La survie observée avec ce traitement est actuellement la meilleure obtenue sur ce modèle F98 particulièrement agressif.

Des résultats similaires ont d'ailleurs depuis été publiés par l'équipe de Barth et des essais cliniques portant sur l'utilisation de carboplatine en association avec une radiothérapie conventionnelle sont en préparation à Colombus aux Etats-Unis (Yang *et al.*, 2010).

II. Quantification des adduits platinés de l'ADN et de l'ARN

Une étude plus fondamentale s'inscrivant dans l'appréhension des mécanismes de toxicité de ce traitement a été réalisée. Elle consiste en la détection et la quantification des adduits platinés de l'ADN et l'ARN. L'activité des deux composés : cisplatine et carboplatine est, en effet, depuis toujours attribuée aux adduits platinés formés avec l'ADN.

Comme on a pu le voir, ces composés échangent leurs ligands chlorés par des groupements hydroxo une fois qu'ils ont pénétré dans la cellule. Ces électrophiles peuvent alors s'additionner sur tout composé nucléophile, tel que le glutathion (Rabik and Dolan, 2007), l'ubiquitine (Hartinger *et al.*, 2008) et l'ADN mitochondrial (Olivero *et al.*, 1997). L'ARN comporte tout comme l'ADN des sites nucléophiles accessibles, et est donc une cible potentielle de ces composés platinés. L'addition du cisplatine sur l'ARN et l'ADN a été évaluée pour des cellules de gliomes F98 par la méthode de quantification de chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem HPLC-MS/MS). Seuls les adduits de l'ADN/ARN majoritairement formés, à savoir les adduits intra-brin entre deux guanines adjacentes sont considérés dans cette étude. Si la quantification des adduits de l'ADN avec cette méthode d'analyse a été décrite par Iijima, aucuns travaux ne rapportent, à l'heure actuelle, la détection des adduits avec l'ARN (Iijima *et al.*, 2004).

II.A. Synthèse des adduits platinés

La synthèse chimique des adduits est nécessaire pour mettre au point la méthode de détection par HPLC-MS/MS. Les nucléotides de départ nécessaires à la synthèse ont été synthétisés sur support solide par la voie des phosphoramidites¹⁴ par Didier Gasparutto (CEA Grenoble). Le dinucléotide dGpdG est synthétisé pour la série 2-désoxyribose. Concernant la synthèse de l'adduit ARN, n'ayant à disposition que des colonnes greffées par des 2-désoxyribonucléotides, l'oligonucléotide GpGpdT a été synthétisé. Les solutions de dGpdG et GpGpdT sont exposées à 5 équivalents de cisplatine pendant 48h à 37°C pour former respectivement, les adduits dGpdG-Pt et GpGpdT-Pt. Les bruts réactionnels sont ensuite purifiés par HPLC. La digestion enzymatique de l'adduit GpGpdT-Pt et la séparation des dinucléosides monophosphates par HPLC permet d'obtenir les adduits platinés de l'ADN et de l'ARN.

II.B. Méthode de quantification

L'analyse de la fraction purifiée du brut réactionnel de l'adduit GpGpdT en Q1 scan est effectuée afin de s'assurer de la nature de l'adduit purifié. Le spectre de masse de l'adduit GpGpdT-Pt est représenté sur la Figure 49.

¹⁴ Groupement protecteur des nucléotides.

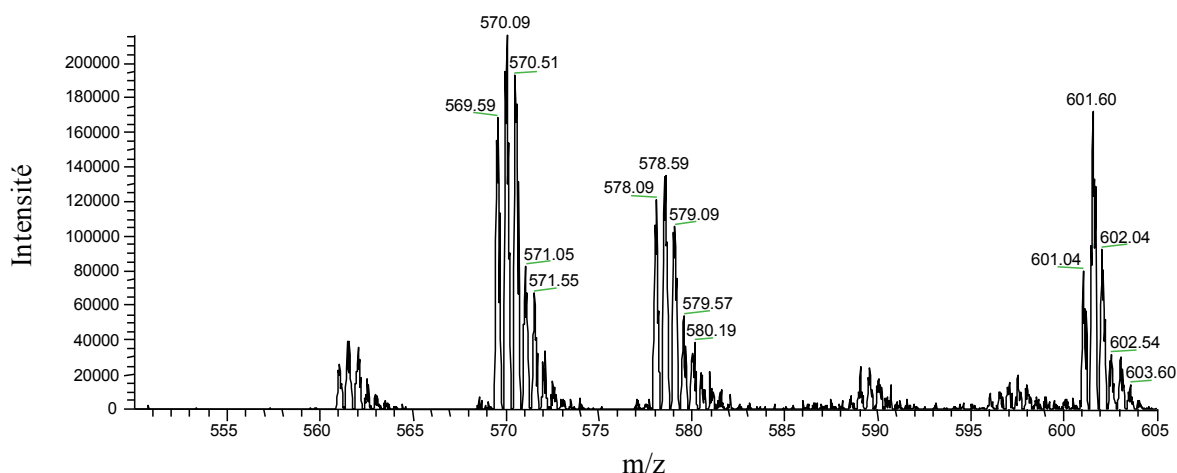


Figure 49 : Spectre de masse de l'adduit GpGpdT-Pt.

Les pics multiples correspondent aux 5 isotopes du platine. Chaque pic est séparé d'une demi unité car le composé est dichargé, chaque unité de masse correspond donc à un rapport m/z de 0,5. L'intensité relative de chaque pic reflète l'abondance des isotopes du platine. Le rapport m/z du composé conduit au massif isotopique centré sur 578 et confirme la masse du produit attendu. Le massif à 570 correspond au rapport m/z à la suite de la perte d'un groupement ammonium.

Les produits purifiés obtenus permettent de détecter les fragments spécifiques et d'optimiser les conditions d'ionisation et de fragmentation. Pour ceci une solution micromolaire du produit est continuellement infusée dans le spectromètre de masse à l'aide d'une pompe à infusion. Dans un premier temps le mode "product ion scan", qui permet de détecter tous les produits de fragmentation d'une molécule donnée, est utilisé. Le premier quadripôle filtre l'ion parent, le second fragmente la molécule et enfin le troisième quadripôle détecte les ions fils issus de la fragmentation. Les transitions spécifiques au composé sont ainsi déterminées, puis utilisées pour optimiser les paramètres d'ionisation et de fragmentation ce qui permet d'optimiser la sensibilité de détection. Les transitions correspondant à la détection des adduits du cisplatine avec 2 guanines d'un brin d'ADN ou d'ARN en mode négatif d'ionisation sont rapportées dans le Tableau 5 et illustrées sur la Figure 50.

Adduits	Transitions	Adduits	Transitions	
Adduit dGpdG-Pt	821 → 804	Adduit GpG-Pt	853 → 836	Perte d'un ammonium
	822 → 805		854 → 837	
	823 → 806		855 → 838	

Tableau 5 : Transitions spécifiques des adduits platinés de l'ADN et de l'ARN.

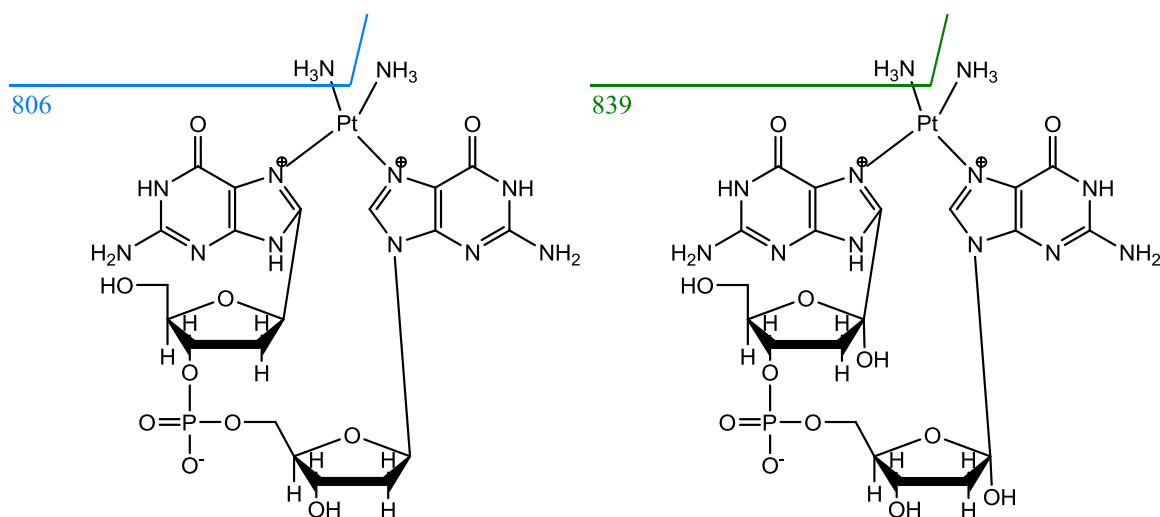


Figure 50 : Adduits platinés de l'ADN et l'ARN et leur principale fragmentation.

La détection en mode MRM (multiple reaction monitoring), qui permet de sélectionner l'ion parent et les ions fils est utilisée pour détecter et quantifier les adduits ARN et ADN tandis que les nucléosides normaux, étant en quantité plus importante, sont détectés en UV à 260 nm. L'injection de standards externes de concentrations connues conduit à la quantification du nombre d'adduits rapporté à la quantité de nucléosides normaux.

Cette méthode de quantification est utilisée pour effectuer une cinétique de formation des adduits de cisplatine avec l'ADN nucléaire et cytoplasmique et avec l'ADN.

II.C. Cinétique de formation des adduits

Des cellules F98 sont exposées à 100 μM de cisplatine, puis après différents temps d'exposition les cellules sont décollées de leur support et les adduits quantifiés.

La lyse des membranes cellulaires et la centrifugation des noyaux permettent de séparer le cytoplasme et le noyau, puis après dégradation des membranes nucléaires, les échantillons sont traités suivant le même protocole. Suite à l'hydrolyse enzymatique des protéines, l'ADN et l'ARN sont précipités. La digestion enzymatique de l'ADN et l'ARN conduit à l'obtention d'un mélange de nucléosides normaux et d'adduits. Ce mélange est ensuite analysé par HPLC-MS/MS. Cette méthode permet de quantifier les adduits du platine avec l'ADN formés dans le noyau et les adduits du platine avec l'ARN formés dans le noyau et dans le cytoplasme. Un exemple de résultat d'analyse effectuée sur le cytoplasme de cellules F98 exposées 8h au cisplatine est présenté sur la Figure 51.

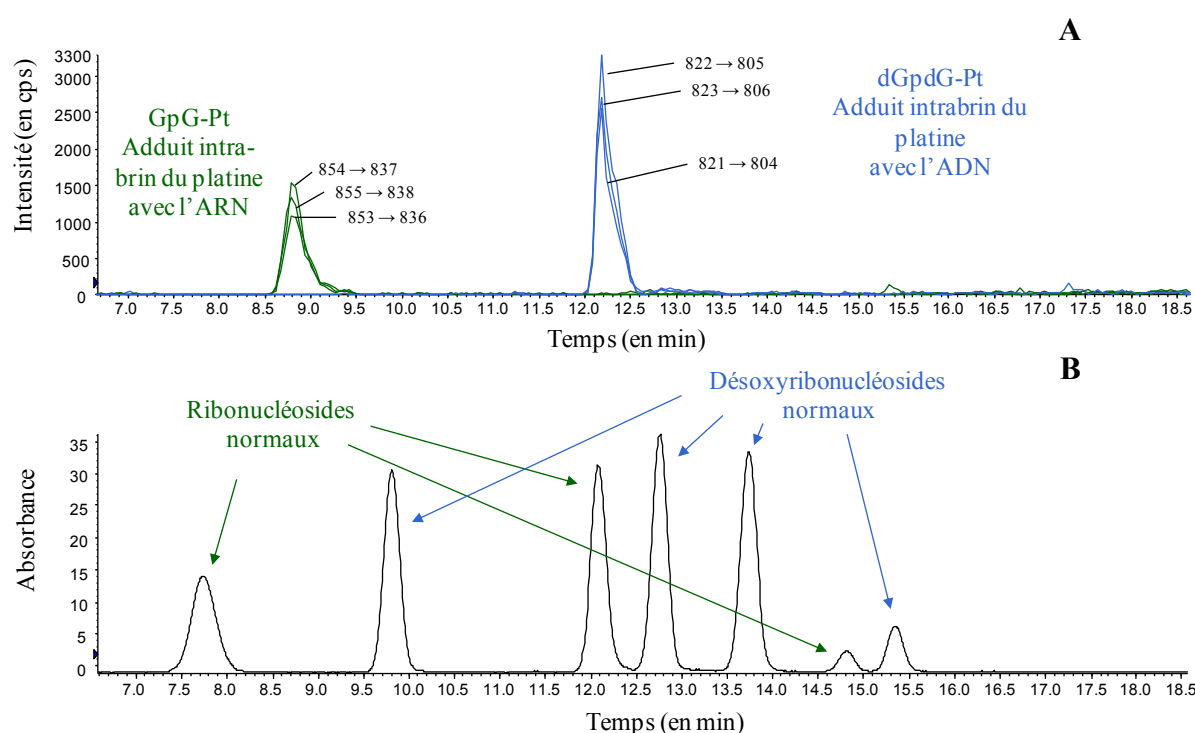


Figure 51 : Chromatogramme UV (A) et de masse (B) d'une solution d'ADN/ARN cytoplasmique.

La présence de toutes les transitions ainsi que leurs intensités relatives permettent une détection très spécifique des adduits. Le pic dont le temps de rétention est de 8,8 min correspond à l'adduit platiné de l'ARN et celui à 12,3 min correspond à celui avec l'ADN. L'intégration de l'aire des pics observés, aussi bien pour les adduits que pour les nucléosides normaux permet une fois rapportée aux aires obtenues pour les standards externes de quantifier les adduits par rapport aux nucléosides normaux.

Les résultats obtenus après l'exposition des cellules au cisplatine sont représentés sur la Figure 52.

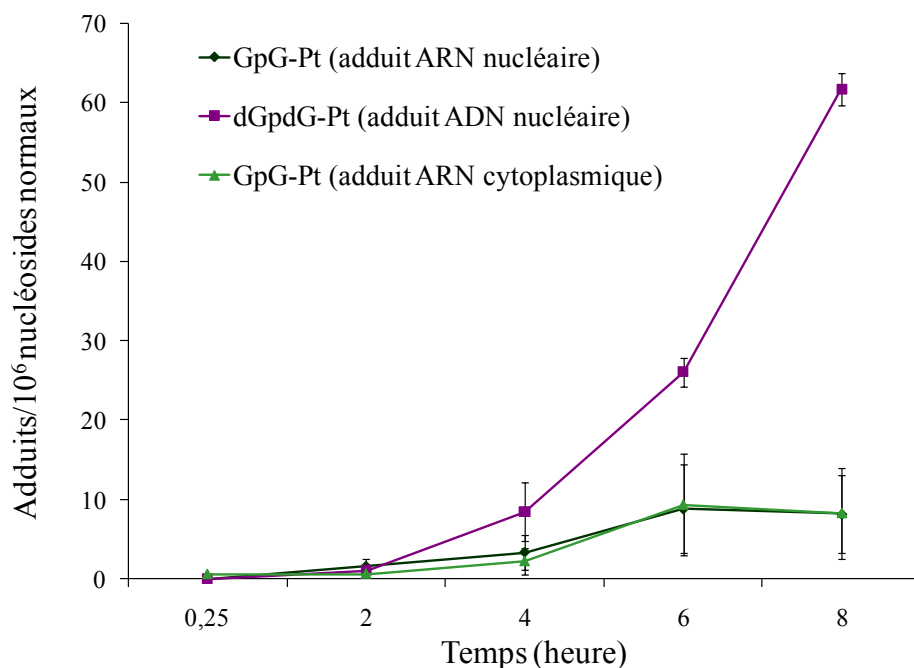


Figure 52 : Cinétique de formation des adduits avec l'ADN et l'ARN de cellules F98 exposées à 100 µM de cisplatine.

On observe sur ce graphique la quantité d'adduit pour 1 million de nucléosides normaux en fonction du temps d'exposition des cellules au cisplatine. Des quantités identiques d'adduits avec l'ARN nucléaire et avec l'ARN cytoplasmique sont observées. Une quantité plus importante d'adduits du platine se forme avec l'ADN. La cinétique n'a pas été conduite plus longtemps puisqu'une quantité importante de cellules sont morte suite à une exposition élevée au cisplatine.

Des adduits du cisplatine avec l'ARN, aussi bien nucléaire que cytoplasmique sont donc formés dans les cellules F98 exposées au cisplatine. A l'heure actuelle aucune étude ne rapporte les conséquences de telles lésions de l'ARN ou bien même un éventuel système de réparation capable de prendre en charge ces dommages. Des conséquences sur la synthèse des protéines sont bien sûr à envisager.

La quantité d'adduits du platine avec l'ADN est toutefois légèrement majoritaire. Le dosage de l'ensemble du platine dans la cellule permettrait de déterminer la distribution subcellulaire du cisplatine. L'ICP-MS, qui permet la détection des éléments, serait une technique adaptée, notamment pour déterminer la quantité d'adduits du platine pouvant se former avec les protéines.

III. Chlorure de chlorotertpyridineplatine, PtTC

III.A. Contexte de l'étude

Suite aux résultats encourageants obtenus dans l'équipe avec le cisplatine et le carboplatine, il est apparu intéressant d'étudier un autre composé platiné qui pénètre dans la cellule et se place au sein même de l'ADN, mais qui présente peu ou pas de toxicité intrinsèque. Le chlorure de chlorotertpyridineplatine (PtTC) est un complexe métallique constitué d'un atome de platine, d'un ligand chloré et d'un groupement tertpyridine (Figure 53).

Il est connu, suite aux travaux de Jennette que les molécules de PtTC interagissent *in vitro* avec l'ADN (Jennette *et al.*, 1974). Ce composé qui est moins toxique que le cisplatine, permettrait ainsi d'augmenter la quantité d'atomes lourds à proximité de l'ADN sans induire de toxicité majeure.

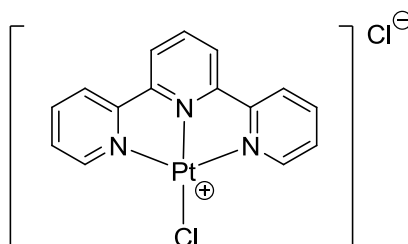


Figure 53 : chlorure de chlorotertpyridine platine (II), PtTC.

Lors de sa thèse Marie-Claude Biston a effectué un test de survie sur des rats porteurs de gliomes après injection de 8 µg de PtTC et d'une irradiation à 78 et 78,8 keV. Aucune augmentation de survie n'est observée, mais un rat traité par le PtTC et l'irradiation à 78,8 keV présente une survie considérablement plus longue que tous les autres animaux (Biston, 2004).

Le potentiel photo-activant du PtTC a été apprécié par des tests de clonogénicité sur des cellules de gliomes F98. La toxicité du PtTC après injection intracérébrale a ensuite été estimée sur des rats sains. Enfin, l'efficacité du traitement combinant PtTC et rayonnement synchrotron a été évaluée.

III.B. Etude de survie cellulaire

La toxicité du PtTC a été évaluée lors des travaux d'Usami sur des cellules CHO (cellules ovariennes d'hamster chinois). Les résultats montrent qu'après 6h d'incubation, aucune toxicité n'est observée et ceci pour des concentrations en produit platiné allant jusqu'à 350 μM (Usami *et al.*, 2007). Pour obtenir une augmentation de dose maximale, il est nécessaire d'obtenir un maximum d'atomes lourds au sein des cellules. Une concentration de 350 μM pendant 24h se révèle toxique pour les cellules F98, nous avons donc choisi d'utiliser une concentration de 350 μM et un temps d'incubation de 7h. Le PtTC qui est acheté sous forme de poudre est pesé puis solubilisé dans de l'eau. Le PtTC a un maximum d'absorption à 278 nm et son coefficient d'extinction molaire est de 25 100 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Jennette *et al.*, 1974), ce qui permet de déterminer la concentration du composé une fois dilué par spectrométrie UV. Les cellules F98 sont incubées avec 350 μM de PtTC, 7h avant l'irradiation et reprises en suspension dans du milieu DMEM sans PtTC pour l'irradiation. Afin de déterminer si la radiosensibilité est due à un effet d'augmentation de dose, 2 énergies sont utilisées, une en dessous du seuil K du platine : 76,6 keV et la seconde au dessus du seuil K : 80,6 keV. Les résultats de cette étude sont représentés sur la Figure 54.

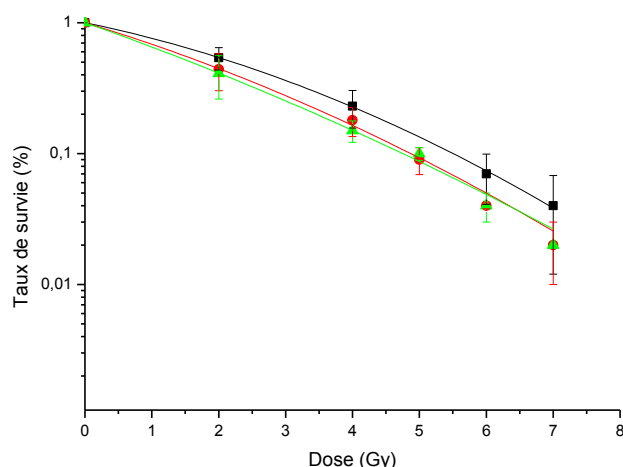


Figure 54 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 76,6 keV (rouge) ou 80,6 keV (vert) avec ou sans (noir) pré exposition de 7h (+/- 30 min) à 350 μM de PtTC. Survie spécifique du PtTC : 0,89.

La courbe noire correspond aux cellules irradiées sans PtTC alors que celles représentant les cellules contenant du PtTC irradiées à 76,6 keV et à 80,6 keV sont respectivement, en rouge et en vert. Pour les cellules contrôle les résultats obtenus pour les 2 énergies sont moyennés car ils ne présentent pas de différence significative.

Une légère diminution du taux de survie des cellules est observée en présence de PtTC. Les résultats sont identiques pour les 2 énergies utilisées. Pour les cellules contrôles la dose nécessaire pour obtenir 10 % de survie est de 5,5 Gy, pour les cellules avec PtTC elle est de 4,9 et 4,8 Gy (respectivement à 76,6 et 80,6 keV), le $SER_{10\%}$ (sensitization enhanced ratio) est donc d'environ 1,13.

Les premiers travaux abordant la distribution du PtTC dans des cellules sont parus au moment où l'on réalisait les expériences. Les conclusions de ce travail sont que le PtTC après incubation est localisé dans le cytoplasme des cellules (Usami *et al.*, 2008). Ceci peut expliquer en partie, le faible SER observé, puisque si les atomes de platine sont dans le cytoplasme et donc éloignés du noyau, et si on considère que l'ADN est la cible principale, seuls les radicaux libres générés et les photo-électrons peuvent impacter l'ADN. Les photoélectrons produits en couche K du platine à une énergie de rayonnement de 80,6 keV ont une énergie d'environ 2 keV ce qui leur permet de parcourir moins d'1 μm . De plus, la concentration en atomes lourds de 68 $\mu\text{g/ml}$ est infime au regard des concentrations en atomes lourds obtenues lors des travaux précédents (quelques mg/ml).

Une étude préclinique a été réalisée en parallèle sur des rats porteurs de gliomes F98.

III.C. Etude de la toxicité du PtTC sur rats sains

Préalablement à cet essai thérapeutique par irradiation synchrotron en présence d'atomes de platine, une étude portant sur la toxicité du PtTC après injection intracérébrale a été menée sur des rats sains. Aucune donnée bibliographique ne donne d'information sur le seuil de toxicité du PtTC injecté par voie intracérébrale.

Le PtTC est injecté par voie intracérébrale, en CED dans les conditions rapportées dans le Tableau 6.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Volume	Concentration	Profondeur
PtTC	Hamilton gastight 50 μL 1705 RN, 32 G	0,5 $\mu\text{L/min}$	20 μL	2,25 mg/ml	7 mm puis 6,5 mm

Tableau 6 : Conditions expérimentales d'injection du PtTC.

Le volume de solution est de 20 μL , 3 concentrations en PtTC sont utilisées : 0,65 mM ; 2,17 mM et 4,94 mM. Pour chaque concentration, 3 groupes sont constitués : euthanasie

à 24h, une semaine et un mois après l'injection de l'agent. Chaque groupe comporte 2 ou 3 rats. Les résultats sont présentés dans le Tableau 7.

Concentration	Nombre de rats/groupe	Toxicité	Survivants	Concentration maximale non toxique
0,65 mM 0,35 mg/ml	9	0	100%	0,65 mM 0,35 mg/ml
2,17 mM 1,16 mg/ml	8	3/8 (petite perte de poids)	100%	
4,94 mM 2,64 mg/ml	7	7/7 (petite perte de poids) 5/7 (hypersensibilité et poils hérissés)	100%	

Tableau 7 : Résultats de l'étude de toxicité sur rats sains.

Aucun rat n'est mort de façon précoce. L'anesthésie des animaux entraîne toujours une perte de poids. Or pour les 2 concentrations de PtTC (2,17 et 4,94 mM) les plus élevées les rats subissent en moyenne une perte de poids un peu plus importante (20-25 g) que celle des autres rats (10-15 g). Concernant le comportement des rats, pour les groupes de rats ayant reçu 0,65 et 2,17 mM, tout est normal alors que 5 des 7 rats ayant reçu 4,94 mM de PtTC présentent une hypersensibilité et ont le poil hérissé pendant les 48h suivant l'injection tandis que les 2 autres rats ne présentent aucun de ces signes. Ensuite ces rats présentent un comportement normal jusqu'à la fin de l'étude (un mois après l'injection).

Une concentration de PtTC de 4,2 mM, (soit 2,24 mg/ml) qui est légèrement inférieure à celle induisant des signes de toxicité sur les rats sains, est choisie pour évaluer ce composé pour la thérapie par renforcement de dose. Cette concentration est 5,5 fois plus élevée que celle utilisée par Biston dans son étude.

III.D. Evaluation de l'efficacité du traitement

Afin d'évaluer l'efficacité du traitement combinant une injection de PtTC et une irradiation à basse énergie, une étude de survie a été réalisée sur des rats porteurs de gliomes.

Les effets de l'injection du PtTC et l'irradiation sont également évalués séparément. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau 8.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ L 1701 RN, 26 G	0,5 μ L/min	non	4 μ L	1000	7 mm puis 6,5 mm
PtTC	Hamilton gastight 50 μ L 1705 RN, 32 G	0,5 μ L/min	-	20 μ L	2,25 mg/ml PtTC	7 mm puis 6,5 mm

Tableau 8 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et du PtTC.

13 jours après l'implantation de la tumeur, le PtTC (45 μ g dans 20 μ L) est injecté par voie intracérébrale. Le lendemain, les rats sont irradiés à 78,8 keV avec une dose de 15 Gy. A J15, les rats sont imagés en mode tomographique suite à l'injection d'ioméron par la veine de la queue afin de vérifier la présence de la tumeur. Enfin, les rats sont pesés de façon régulière jusqu'à leur mort. Les rats présentant des signes de souffrance sont euthanasiés. 5 animaux n'ayant pas de tumeur visible à l'imagerie ont été exclus de l'étude.

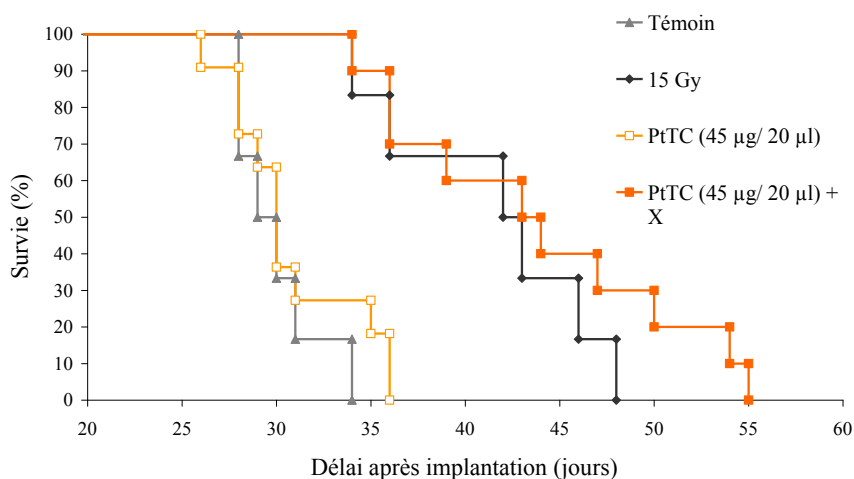


Figure 55 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par : irradiation de 15 Gy, injection CED de PtTC, injection de PtTC associé à 15 Gy. Les temps de survie sont indiqués en jours après l'inoculation de 1000 cellules F98 (J0) ; la chimiothérapie est administrée à J13; la radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, en mode SSR (78,8 keV).

Sur ces courbes de Kaplan-Meyer, sont représentées les courbes de survie des 4 groupes de traitement et les valeurs des différentes survies sont résumées dans le Tableau 9.

Groupe	Survie (en jours)			% ILS	
	intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
témoin	28-34	30 \pm 2,3	29,50	-	-
PtTC	26-36	30,8 \pm 3,4	30,00	2,67	1,69
15 Gy	34-48	41,5 \pm 5,5	42,50	38,33	44,07
PtTC + 15 Gy	34-55	43,8 \pm 7,6	43,50	46,00	47,46

Tableau 9 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats traités par du PtTC et/ou une irradiation de 15 Gy à 78,8 keV.

Sur la Figure 55, on observe que les courbes de survie des rats témoins et des rats ayant reçu le PtTC ne diffèrent pas. De même pour la survie des rats irradiés avec ou sans PtTC, bien que 2 rats irradiés en présence de PtTC vivent quelques jours de plus que tous les autres rats.

On peut donc en conclure tout d'abord que le PtTC n'induit pas de toxicité apparente pour les rats porteurs de gliomes, ni d'effet chimiothérapeutique, puisque les courbes de survie des rats témoins et des rats ayant reçu le PtTC ne sont pas significativement différentes. Bien que quelques animaux vivent plus longtemps que les rats irradiés, la combinaison du PtTC avec une irradiation de 15 Gy, n'augmentent pas significativement la survie des animaux.

Des études complémentaires pourraient être conduites pour optimiser la distribution et l'internalisation *in vivo* du PtTC. Une infusion prolongée permettrait peut-être d'augmenter la quantité de platine internalisée dans les cellules et d'améliorer l'effet thérapeutique.

Chapitre 2

Augmentation de dose par une irradiation synchrotron en présence d'agents iodés

I. Contexte de l'étude

Suite aux bons résultats obtenus par l'équipe de Norman (Norman *et al.*, 1997) avec un scanner et des agents de contraste, la combinaison de ceux-ci avec le rayonnement synchrotron monochromatique a été évaluée comme traitement potentiel des gliomes. L'avantage du rayonnement synchrotron monochromatique par rapport à un scanner conventionnel réside dans le fait qu'il permet d'éviter le phénomène de durcissement du faisceau. Le durcissement du faisceau correspond à l'évolution du spectre polychromatique vers les hautes énergies. En effet les basses énergies ont une plus grande probabilité d'interagir avec le milieu entraînant une augmentation de l'énergie moyenne du faisceau avec l'épaisseur du tissu traversé. La distribution de dose est donc inhomogène et l'os reçoit une dose plus importante, correspondant en partie aux photons de faibles énergies peu pénétrants. L'utilisation d'un faisceau monochromatique a été proposée dès 1998 par Solberg (Solberg *et al.*, 1992) pour optimiser les conditions d'irradiation et des études combinant ce mode d'irradiation et l'utilisation d'atomes lourds ont été développées et regroupées sous le nom de radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (Synchrotron Stereotactic RadioTherapy, SSRT).

Dans le cadre de la thèse de Jean-François Adam, les premiers essais ont été réalisés dans l'équipe sur des rats porteurs de gliomes. Une irradiation monochromatique à 50 keV de 15 Gy combinée à une injection carotidienne d'ioméron (agent de contraste iodé) a révélé une augmentation significative mais faible de la survie des rats (Adam *et al.*, 2003). En effet, la localisation de ces tumeurs pose un problème d'accessibilité des agents contenant des atomes lourds au site d'intérêt. Cette difficulté est d'autant plus importante que, de la concentration en atomes lourds dépend l'efficacité du traitement. Une autre méthode d'injection a été explorée avec l'injection concomitante d'agent de contraste et de mannitol, agent qui induit la perméabilisation de la BHE. Deux voies d'injection, en intraveineuse (i.v) ou en intracarotidienne (i.c), ont été reportées et combinées à une irradiation monochromatique à

50 keV. L'association du mannitol et de l'iode a permis d'atteindre des concentrations en iode dans la tumeur plus importante (4,4 et 20,5 mg/ml respectivement en i.v et en i.c) ce qui a conduit à une amélioration des médianes de survie des animaux (Adam *et al.*, 2005). Des essais cliniques portant sur le traitement de métastases cérébrales sont en préparation sur la ligne ID17 de l'ESRF suite notamment à ces travaux et à ceux de Rose et Norman (Norman *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1999).

Comme on a pu le voir avec le carboplatine et le PtTC, une autre approche de la SSRT est également développée avec l'utilisation de composés permettant la présence des atomes lourds au contact même de l'ADN. En effet si on considère un agent de contraste iodé irradié à 50 keV, l'énergie des photoélectrons résultant est d'environ 17 keV, ce qui leur permet de parcourir environ 8 μm (d'après le NIST). Les électrons Auger ont quant à eux une énergie inférieure à 3 keV et un parcours moyen de quelques dizaines de nm. La photoactivation¹⁵ par agent extracellulaire, tel que des agents de contraste iodés, n'induit donc pas de cascades Auger à proximité de l'ADN et seuls les photoélectrons ont suffisamment d'énergie pour ioniser le milieu et générer des dégâts au niveau de l'ADN. Provoquer des cascades d'électrons Auger à proximité immédiate du matériel génétique des cellules permettrait d'induire des ionisations multiples et localisées de l'ADN augmentant considérablement la probabilité d'induction de la mort cellulaire.

La capacité d'un composé iodé qui s'incorpore dans l'ADN, la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IUdR) à induire une augmentation de dose a été évaluée lors de test de survie cellulaire sur des cellules de gliome de rat.

II. 5-iodo-2'-désoxyuridine, IUdR

La 5-iodo-2'-désoxyuridine (IUdR) est un analogue de la thymidine, connu depuis plus de 50 ans. Le rayon de Van Der Waals de l'atome d'iode (2,15 Å) étant comparable à celui du groupement méthyl de la thymidine (2,0 Å), l'IUdR entre en compétition avec la thymidine lors de la synthèse de l'ADN (Figure 56).

¹⁵ La photoactivation est spécifique aux photons et concerne la toxicité d'un composé induite par un rayonnement photonique.

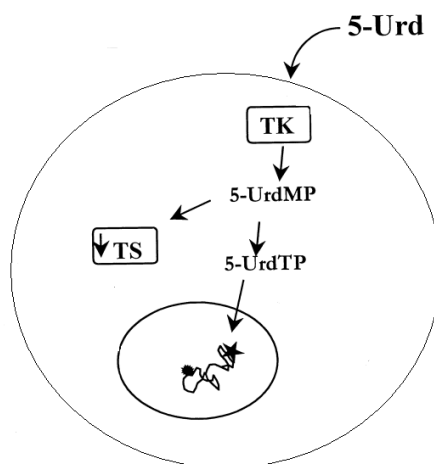


Figure 56 : Anabolisme de l'IUdR adapté de (Berry *et al.*, 1999).

L'IUdR de par son caractère hydrophobe traverse difficilement la bicouche lipidique des membranes biologiques, la présence de transporteur de nucléosides assure donc l'entrée du composé dans l'espace intracellulaire (Fang *et al.*, 1996). Après pénétration dans le cytoplasme, l'IUdR emprunte la voie de récupération (en opposition à celle *de novo*) des 2'-désoxyribonucléosides pour s'incorporer dans l'ADN. Tout comme la thymidine, l'analogue iodé est phosphorylé en IUdR triphosphate par la thymidine kinase (TK). La voie de synthèse *de novo* de la thymidine passe quant à elle par l'action de la thymidylate synthétase (TS). Cette enzyme permet aussi la déshalogénéation de l'IUdR, ce dernier devient alors substrat pour la synthèse de la thymidine monophosphate (Pressacco *et al.*, 1994). Ces composés (thymidine et IUdR) sont ensuite en compétition lors de leur incorporation dans l'ADN par des polymérases. L'analogue iodé peut être incorporé dans l'ADN pour former la paire A : IUdR ou le mésappariement G : IUdR. Le premier provient de l'incorporation de l'IUdR en face de A alors que le second mésappariement peut provenir soit de l'incorporation de l'IUdR en face de G ou de la mauvaise incorporation de G en face de l'IUdR.

L'IUdR, tout d'abord destiné à être un agent antinéoplasique, s'est révélé avoir une cytotoxicité limitée mais être un radiosensibilisateur efficace. Un composé radiosensibilisant est un agent qui par sa présence dans le milieu augmente l'effet d'un rayonnement sur la matière traversée. La radiosensibilisation de l'IUdR est connue depuis les années 60 et a été décrite comme étant directement corrélée à son taux d'incorporation dans l'ADN. Son incorporation dans les cellules en division en fait un marqueur de l'activité de prolifération cellulaire.

L'IUdR par sa présence au sein de l'ADN, et donc la production d'électron Auger au sein même de la cible, paraît être un composé de choix pour le développement de la SSRT. D'autre part, son incorporation sélective dans les cellules en division, et donc préférentiellement dans les cellules tumorales en font un agent intéressant particulièrement pour le cerveau qui contient des tissus sensibles qui sont à renouvellement lent ou quasi-inexistant.

II.A. Incorporation de l'IUdR dans l'ADN

II.A.1 Résultats

Avant toute expérience de survie cellulaire, il s'est avéré indispensable de déterminer et fixer les conditions d'exposition des cellules à l'IUdR et de s'assurer que ces conditions conduisaient à un taux de substitution de la thymidine par l'IUdR reproductible. Pour ceci une concentration de 10 μM d'IUdR est choisie et la cinétique d'incorporation de l'IUdR dans l'ADN des cellules de gliome F98 est évaluée. Les cellules F98 sont des cellules adhérentes, elles sont ensemencées dans des flasques de culture à faible densité. En effet, l'IUdR s'incorporant lors de la division cellulaire il est important que les cellules soient en phase exponentielle de croissance. Après l'adhésion des cellules à la flasque, de l'IUdR (10 μM) est ajouté au milieu de culture (qui ne contient pas de thymidine). Une étude préliminaire nous a permis de déterminer que la concentration en IUdR est largement diminué 24h après son ajout dans un milieu de culture à 37°C, 10 μM d'IUdR est donc ajouté au milieu toutes les 24h. A différents temps d'incubation, les cellules sont décollées par tripsination, puis le culot cellulaire est congelé. Après extraction et digestion enzymatique de l'ADN, le mélange de nucléosides normaux et d'IUdR est analysé par HPLC-MS/MS. Les nucléosides non modifiés sont quantifiés en UV tandis que le triple quadripôle du spectromètre de masse permet une détection très spécifique de l'IUdR. Sur la Figure 57, est représenté le pourcentage d'IUdR incorporée par rapport aux nucléosides normaux et la quantité de cellules en fonction du temps d'incubation avec l'IUdR.

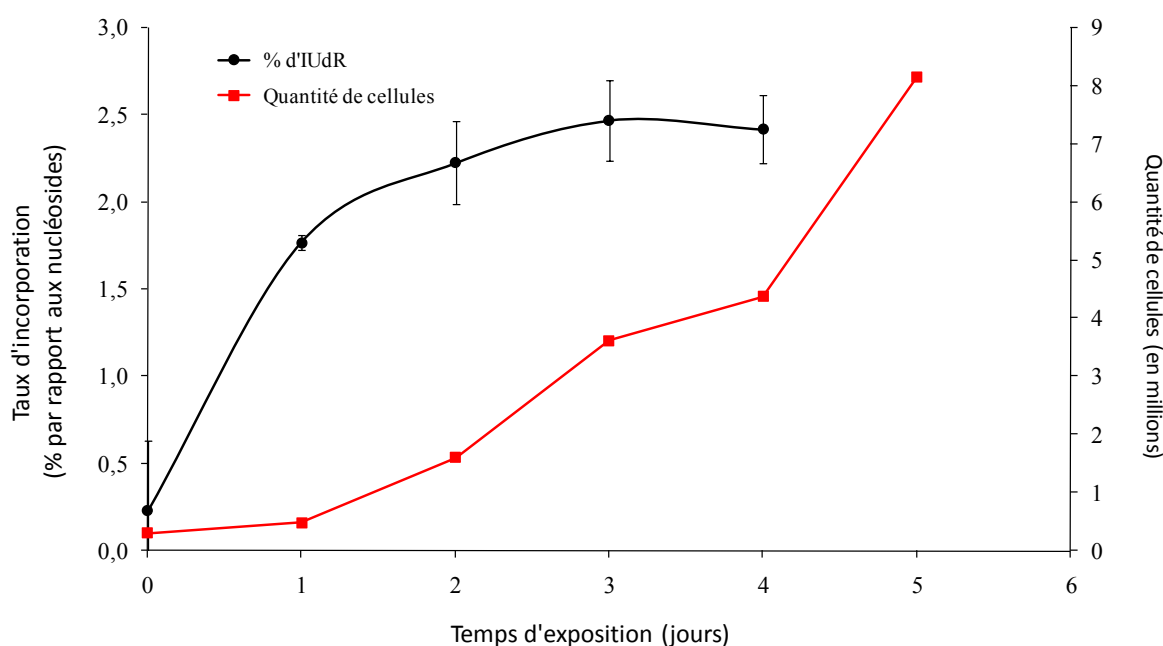


Figure 57 : Cellules F98 exposées à 10 μ M d'IUdR (de l'IUdR est ajouté au milieu de culture tous les jours).

Le taux d'incorporation de l'IUdR augmente avec le temps d'exposition à l'agent, et il est de 1,7% après 24h d'incubation. Un plateau semble être atteint après deux jours d'incubation avec l'IUdR. Il a été décrit que l'IUdR peut inhiber ou ralentir la croissance cellulaire. Or le dénombrement des cellules permet de constater que ce plateau est observé bien que les cellules soient encore dans la phase exponentielle de croissance. 2,2% d'IUdR en moyenne est incorporé en 48h, ce qui représente environ 9% de remplacement de la thymidine. Dans les conditions expérimentales présentes, l'IUdR ne ralentit pas la croissance cellulaire.

II.A.2 Discussion

En 1990, Lawrence et collaborateurs ont rapportés des observations similaires lors d'étude sur des cellules de carcinomes humains de colon (HT29). Les cellules sont exposées à 10 μ M d'IUdR avec un changement de milieu toutes les 24h, puis l'IUdR est quantifié par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le taux d'IUdR incorporé croît jusqu'à atteindre un plateau à 4 jours pour lequel il atteint environ 30% de remplacement de la thymidine comme illustré sur la Figure 58.

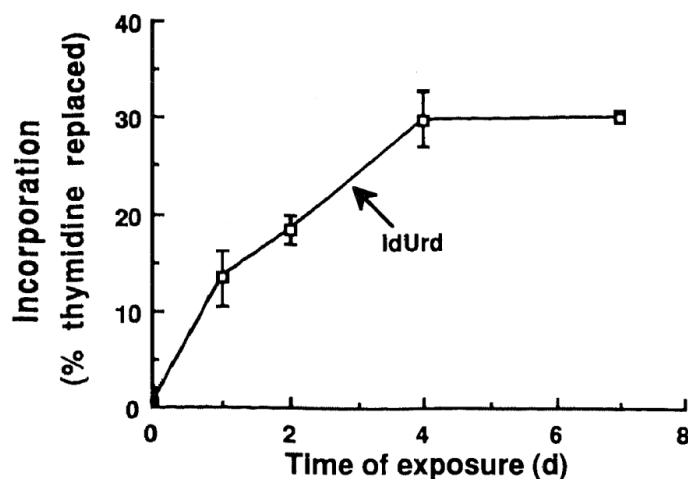


Figure 58 : Cellules exposées à 10 μ M d'IUdR pendant les temps indiqués. L'incorporation d'IUdR dépend du temps d'exposition (Lawrence *et al.*, 1990).

Les temps de doublement des cellules sont alors déterminés afin de s'assurer que l'IUdR n'inhibe pas la réplication des cellules.

Days of exposure	Doubling time (hr)
	IdUrd
0	20.5 \pm 2.1
1	23.1 \pm 2.6
2	26.1 \pm 1.8
4	31.8 \pm 2.1
7	45.3 \pm 1.3

Figure 59 : L'exposition à l'IUdR augmente le temps de doublement des cellules HT29 (Lawrence *et al.*, 1990).

Une augmentation modérée des temps de doublement des cellules est observée (Figure 59) mais cette inhibition seule ne permet pas d'expliquer ce plateau.

La cinétique ainsi que le taux d'incorporation de l'IUdR dans l'ADN, sont différents selon que l'on considère des cellules de carcinomes ou des cellules de gliomes. Un phénomène commun de saturation de l'incorporation est toutefois constaté et l'inhibition de la réplication par l'IUdR ne paraît pas être responsable. Un équilibre entre l'incorporation de l'IUdR et la réparation de ce dommage pourrait expliquer le phénomène observé. La

prépondérance de la voie *de novo* des nucléosides, qui permet une déshalogénation de l'IUdR et une incorporation en faveur de la thymidine, est également envisageable.

II.B. Cytotoxicité de l'IUdR

II.B.1 Résultats

Un test de clonogénicité nous a permis de déterminer le taux de survie associé au taux de remplacement de la thymidine de 9% obtenu après deux jours d'incubation. Le taux de survie est alors de 58% (valeur normalisée par le plating efficiency¹⁶ des cellules F98).

II.B.2 Discussions

Dans les travaux de Lawrence, la toxicité engendrée par l'incorporation est nulle après une journée d'exposition à l'IUdR mais le taux de survie diminue à 50% suite à 2 jours d'incubation (Lawrence *et al.*, 1990). Dans une étude récente de Dugas, 3 taux d'incorporation de l'IUdR ont été étudiés. Ces différentes proportions de remplacement de la thymidine, 9,2%, 12% et 16,6% ont cette fois été obtenues après une incubation de 27h avec respectivement 5, 10 et 20 μ M d'IUdR. La survie cellulaire n'est que faiblement affectée par la présence de l'IUdR au sein de l'ADN puisque les taux de survie sont respectivement de 88, 96 et 72% (Dugas *et al.*, 2010).

Après deux jours d'incubation, la toxicité observée avec notre modèle F98 est similaire à celle obtenue avec les cellules HT29, bien que les taux d'incorporation s'avèrent être différents (9% pour les F98 et 17% pour les cellules HT29). Concernant les résultats de Dugas le même taux d'incorporation de l'IUdR (environ 9%) conduit à un taux de survie de 88% (cellules CHO), supérieur à celui des cellules F98 (58%).

En conclusion, l'incorporation de l'IUdR à un temps donné est moins importante pour le modèle F98 et à taux d'incorporation identique, une toxicité plus importante est observée. Pour toutes les études abordées ici la survie est analysée par un test de clonogénicité alors que le remplacement de la thymidine par l'IUdR est quantifié par différentes méthodes et ceci peut notamment expliquer les différences observées. Alors que les méthodes de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, utilisée dans l'étude présente et dans

¹⁶ Taux de survie des cellules sans exposition au stress. Ce facteur est spécifique à chaque lignée cellulaire.

celle de Dugas, permettent une grande spécificité de la détection de l'IUdR, la méthode de quantification par de l'iode radioactif utilisé par Lawrence permet la détection de la radioactivité globale ce qui n'est nullement spécifique de l'IUdR et peut conduire à une surévaluation de la quantité d'IUdR.

Les différences dans l'incorporation de l'IUdR et la toxicité associée pourraient également être expliquées par la dépendance de ces facteurs au type cellulaire considéré.

Des études traitant principalement de la radiosensibilisation de l'IUdR mais rapportant quelques informations sur la toxicité observée pour des taux d'incorporation donnés, sont reportées dans le Tableau 10. Les conclusions sont identiques à celles issues de la comparaison avec les études précédentes et de façon générale à concentration et temps d'exposition identiques, des taux d'incorporation plus élevés sont obtenus que ceux présentés ici et la toxicité induite est moins importante que celle rapportée dans ce travail.

En effet, la toxicité de l'IUdR (10 μ M pendant 48 heures) sur des cellules de carcinomes humains (SQ20B) est de 70% d'après les travaux de Stéphanie Corde (Corde *et al.*, 2004). D'après Berry et coll. la survie des cellules de carcinomes humains de colon (HCT116) incubées 18h avec 10 μ M d'IUdR est d'environ 50% avec un taux de remplacement de la thymidine d'environ 10% (Berry *et al.*, 1999). Une étude de Nath et coll. datant de 1987 ne rapporte aucune toxicité pour des cellules de poumons d'hamster chinois exposé 3 jours à 10 μ M d'IUdR (le milieu contenant l'IUdR est changé 2 fois par jour), le pourcentage de remplacement de la thymidine par l'IUdR à 3 jours est alors de 18% (Nath *et al.*, 1987).

Or même si les mécanismes de cytotoxicité de l'IUdR ne sont pas encore bien connus les systèmes de réparation par mésappariement (MMR) et par excision de bases (BER) semblent être impliqués et les conclusions des travaux sur le sujet sont décrites ici.

II.B.3 Mécanisme de cytotoxicité de l'IUdR

Parmi les composants du MMR, 2 protéines (hMLH1 (Berry *et al.*, 1999), MSH2 (Berry *et al.*, 2000)) sont engagées dans le processus de réparation des lésions IUdR. De façon générale, leur déficience au sein du MMR induit une augmentation de l'incorporation, de la cytotoxicité et de la radiosensibilité des cellules contenant de l'IUdR ainsi qu'une persistance dans le temps des dommages. Ceci est surprenant puisque comme on l'a vu précédemment, les cellules déficientes en MMR présentent une résistance à une large gamme d'agents

chimiothérapeutiques incluant : témozolomide, procarbazine, étoposide, cisplatine, carboplatine... Parmi tous les mésappariements de bases non modifiées, le complexe MutS α (dimère MSH2/MSH6) du MMR présente une plus grande affinité avec le mésappariement G : T et répare celui-ci avec une plus grande efficacité. Or ce complexe protéique qui a une moins bonne affinité avec les adduits cisplatine, O⁶-méthylguanine qu'avec le substrat G : T, se lie plus facilement à l'ADN contenant G : IUdR qu'au mésappariement G : T. L'hypothèse avancée est que le rayon de Van Der Waals de l'iode étant légèrement plus important que celui de groupement méthyl, l'atome d'iode engendre une distorsion de l'hélice d'ADN plus importante ce qui induirait une meilleure affinité avec l'enzyme. Il est important de noter que ce complexe n'a qu'une très faible activité avec l'IUdR quand celui-ci est apparié avec l'adénine, suggérant que le système MMR n'est pas impliqué dans la réparation de ces lésions (Berry *et al.*, 2003).

D'autre part, le BER est le système de réparation de l'ADN approprié pour réparer les dommages créés par l'IUdR puisqu'il prend en charge les dommages de base et les SSB. Or son inhibition et plus particulièrement la déficience en protéine XRCC1 conduit à une augmentation de la cytotoxicité et de la radiosensibilisation de l'IUdR, sans induire de taux plus élevé d'IUdR incorporé (à 24h). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la sensibilité à l'IUdR résulterait plus d'un défaut de réparation plutôt que d'une diminution de l'incorporation de l'IUdR (Taverna *et al.*, 2003). D'autre part, la protéine MED1 qui agit comme une thymidine/uracile N-glycosylase sur les mésappariements, hydrolyse les résidus uracile/thymine des sites hémiméthylés CpG contenant le mésappariement G : IUdR 40 fois plus rapidement que ceux contenant G : T. Les mésappariements A : IUdR induisent quant à eux une très faible activité de MED1. De façon intéressante ces différentes affinités sont semblables à celles observées lors de la reconnaissance du complexe MutS α du MMR avec les différents mésappariements. Ces résultats sont obtenus lors de l'hydrolyse d'oligonucléotides contenant différentes séquences par un domaine de la protéine MED1. Des tests de survie cellulaire (MTT et clonogénicité) sur des lignées cellulaires déficientes ou non pour le gène MED1 permettent de corroborer ces résultats. Une sensibilité accrue des cellules déficientes en MED1 à l'IUdR a en effet été observée et paraît être associée à une incorporation plus importante ou un taux d'excision de l'IUdR réduit (Turner *et al.*, 2006).

Actuellement aucune étude ne rapporte le niveau d'expression de ces protéines du MMR et du BER dans le modèle F98. Il est donc difficile d'établir un lien entre l'activité de ces deux systèmes de réparation et la cytotoxicité considérable de l'IUdR sur les cellules F98.

Pour chaque expérience réalisée au cours de ce travail, les cellules sont exposées à l'IUdR dans les conditions décrites ci-dessus et la quantité d'IUdR est vérifiée et approxime 9% de remplacement de la thymidine par l'IUdR.

III. IUdR et rayonnement

Avant d'évaluer le potentiel de l'IUdR à induire une augmentation de la toxicité liée au rayonnement synchrotron, le choix de l'énergie d'irradiation est exposé.

III.A. Recherche de l'énergie optimale

Tout d'abord le rappel de quelques notions est nécessaire à la bonne compréhension de ce travail, en commençant par une notion très employée, la dose.

La dose est la quantité d'énergie déposée par unité de masse. Elle s'exprime en Gray (Gy), 1 Gy correspond à un dépôt d'énergie de 1 joule par kilogramme de matière.

$$D = N \times E \times \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right) \times 1000$$

Où D est la dose en Gy/s, N, le nombre de photons en cm²/s, E, l'énergie des photons en J, μ_{en} le coefficient d'absorption en cm⁻¹ et ρ la masse volumique en g/cm³.

La dose est dépendante du flux de photons (produit de la quantité de photon et de leur énergie) et du coefficient d'absorption massique du milieu traversé. Le rayonnement étant de même nature et de même énergie pour l'ensemble de la cible, c'est donc bien la matière traversée qui peut induire un différentiel entre la dose absorbée par le tissu sain et le tissu tumoral. Du point de vue de l'absorption ces deux tissus sont indifférenciés, c'est pourquoi il est nécessaire d'introduire un autre paramètre. Comme on a pu le voir le rayonnement synchrotron est un rayonnement de basses énergies, pour lesquelles le coefficient d'absorption massique est dépendant du numéro atomique de l'élément traversé. La présence d'atomes lourds au sein même de la zone tumorale permettrait donc un dépôt de dose plus important localisé sur la cible.

- **Facteur d'augmentation de dose (DEF)**

Ce différentiel est exprimé sous forme de facteur d'augmentation de dose qui est défini comme suit :

$$DEF = \left(\frac{\text{dose dans les tissus contenant des atomes lourds}}{\text{dose dans les tissus}} \right)$$

Ce facteur d'augmentation de dose représente donc le ratio entre la dose dans la matière contenant les atomes lourds par rapport à la dose dans la matière sans ces éléments lourds. Ce facteur d'augmentation est souvent dénommé "DEF" pour "Dose Enhancement Factor".

La dose dépendant de l'énergie des photons, celle-ci doit être déterminée. L'énergie optimale sera celle qui permettra le plus grand différentiel entre la dose déposée aux tissus contenant les atomes lourds et ceux sans atomes lourds. Deux paramètres, le coefficient d'absorption massique et le coefficient d'atténuation massique peuvent quantifier le dépôt d'énergie.

- **Coefficient d'absorption massique et coefficient d'atténuation**

Comme on l'a vu précédemment, lors de l'interaction d'un photon avec la matière traversée une partie de l'énergie est libérée localement par les électrons et une autre fraction est déposée à distance via les photons. Le coefficient d'atténuation (μ) massique représente la probabilité d'occurrence d'un type d'interaction particulier. Le coefficient d'absorption (μ_{en}) massique d'énergie rassemble toutes les interactions et renseigne sur la fraction d'énergie déposée localement. Or, en radiothérapie, c'est l'énergie déposée localement qui importe, et le coefficient d'absorption massique est donc à considérer. Pour définir de façon théorique, l'énergie pour laquelle le facteur d'augmentation de dose est le plus élevé, il faut donc se rapporter aux courbes du coefficient d'absorption massique en fonction de l'énergie pour les éléments considérés. Les tissus sont assimilables à de l'eau et pour les tissus contenant des atomes lourds, l'équation est la suivante :

$$\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{\text{mélange}} = \sum w_i \left(\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_i \right), \text{ avec } w_i = \frac{m_i}{M}$$

Où m_i est la masse de l'élément et M , la masse totale.

Le coefficient d'absorption massique du mélange est donc la somme des produits de la fraction massique et du coefficient d'absorption massique. Sur la Figure 60 sont représentés les coefficients d'absorption massique de l'eau et d'une solution aqueuse iodée (10 mg/ml en iode) en fonction de l'énergie des photons.

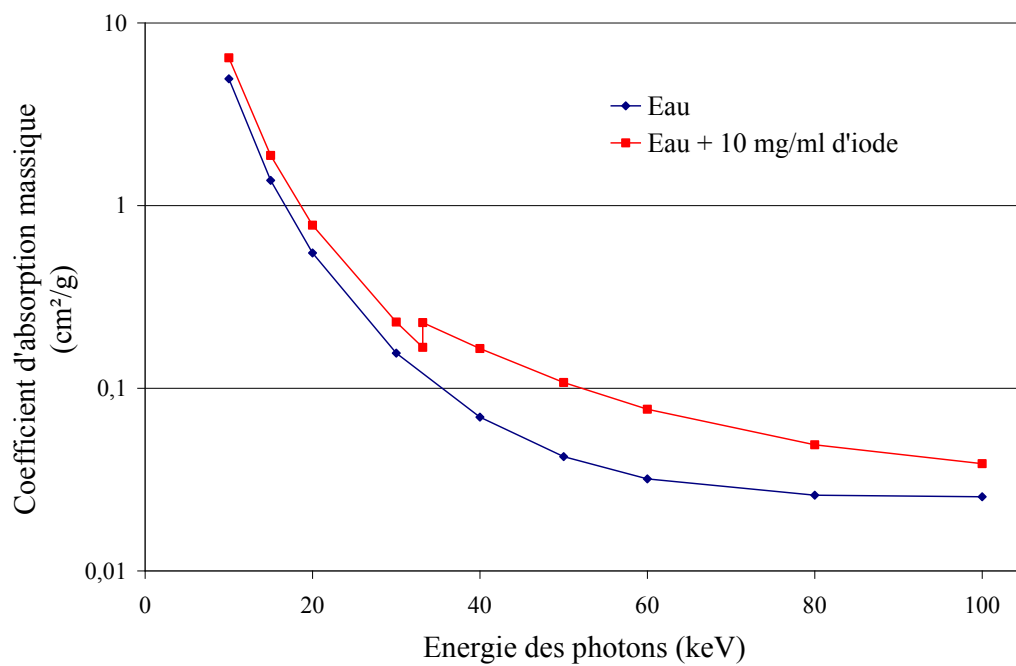


Figure 60 : Coefficients d'absorption massique de l'eau et d'un milieu iodé à 10 mg/ml (d'après le NIST) dans la gamme d'énergie utilisée pour la radiothérapie par rayonnement synchrotron.

La Figure 61 représente le facteur d'augmentation de dose pour un milieu aqueux iodé à 10 mg/ml en fonction de l'énergie.

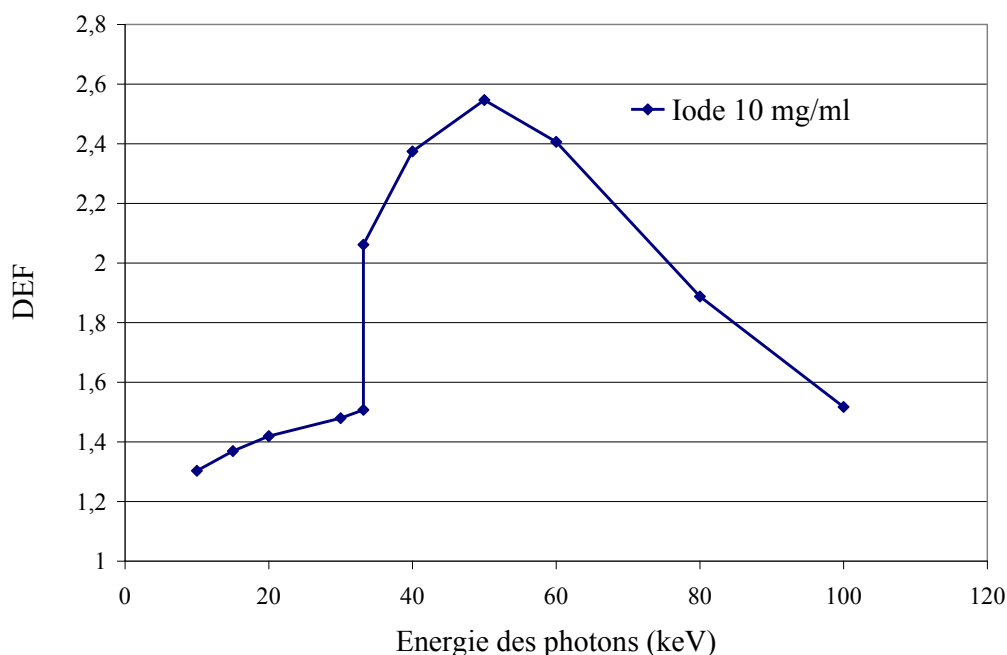


Figure 61 : Facteur d'augmentation de dose pour un milieu contenant 10 mg/ml d'iode pour la gamme d'énergie disponible sur la ligne médicale.

On remarque qu'il existe une plage d'énergies (40-60 keV) pour laquelle le DEF est maximal. Le DEF atteint un maximum d'environ 2,5 à 50 keV pour un milieu contenant 1% d'iode. L'énergie de 50 keV est donc choisie pour l'irradiation des cellules F98 en présence d'agents iodés.

III.B. Etude de survie cellulaire

III.B.1 Résultats

L'efficacité de l'IUdR à induire une augmentation de la toxicité liée au rayonnement synchrotron est évaluée lors de test de clonogénicité sur des cellules F98. Les conditions d'irradiation des cellules sont décrites dans le chapitre Techniques expérimentales. Sur la Figure 62 est représentée l'évolution du taux de survie en fonction des doses d'irradiation de rayons X monochromatique de 50 keV en présence ou non d'IUdR dans les cellules.

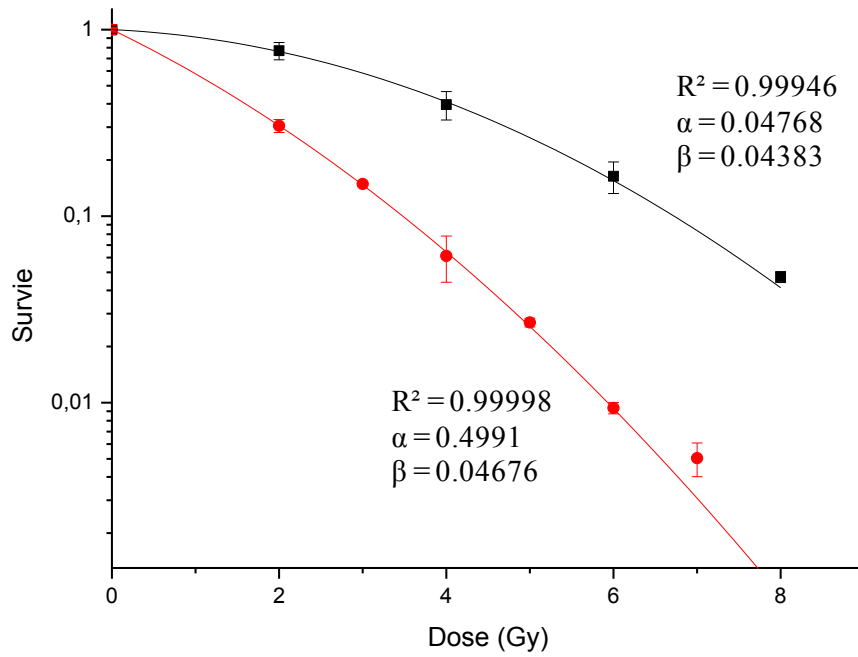


Figure 62 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV avec (rond rouge) ou sans (carré noir) pré-exposition de 48h à 10 μ M d'IUdR. Survie spécifique des cellules IUdR : 0,58.

La courbe en noire correspond à la survie des cellules contrôle (sans IUdR) irradiées à 50 keV tandis que celle en rouge correspond aux cellules ayant été exposées 48h à l'IUdR. La survie est normalisée par rapport au plating efficiency¹⁷ des cellules F98 (78%) et à la survie spécifique à l'IUdR (toxicité à 0 Gy, 45%) pour les cellules irradiées en présence d'IUdR.

On remarque qu'en présence d'IUdR la toxicité du rayonnement sur les cellules est augmentée. Pour quantifier cet effet, le facteur d'augmentation de la sensibilité peut être déterminé. Le facteur d'augmentation de la sensibilité (Sensitization Enhanced Ratio, SER), pour un niveau de survie S donnée, se définit comme le rapport des doses nécessaires pour obtenir cet effet.

$$SER_s = \frac{Dose_s (Contrôle)}{Dose_s (Iode)}$$

Comme employée couramment, la dose nécessaire pour induire 10% de survie est évaluée. Or dans les conditions présentes, pour les cellules contrôle la dose nécessaire est de

¹⁷ Plating efficiency : rapport entre le nombre de colonies comptées et le nombre de cellulesensemencées.

6,72 Gy et elle est de 3,48 Gy pour les cellules contenant l'IUdR, le DEF est donc égal à 1,93. L'effet de radiosensibilisation des cellules F98 par l'IUdR est ainsi confirmé.

L'IUdR étant connu comme radiosensibilisateur, il est intéressant de déterminer quelle part de l'effet observé est imputable à la radiosensibilisation et quelle autre part est attribuable à l'effet photoélectrique et plus particulièrement aux électrons Auger. Une expérience similaire a donc été réalisée avec une irradiation conventionnelle fourni par une source de ^{60}Co (1,25 MeV) afin d'observer l'effet radiosensibilisant de l'IUdR sur ce modèle cellulaire. Le résultat est représenté sur la Figure 63.

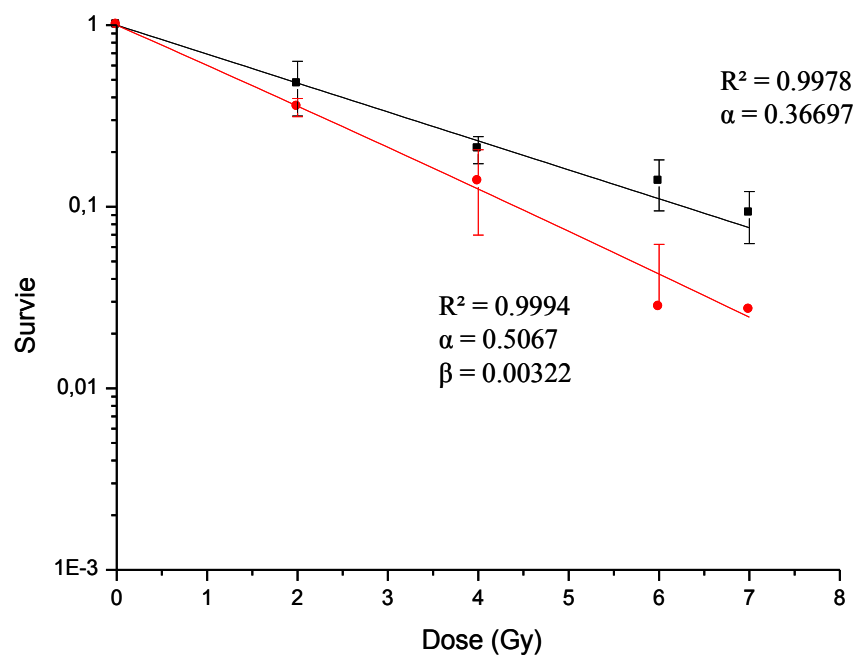


Figure 63 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 1,25 MeV avec (rond rouge) ou sans (carré noir) pré-exposition de 48h à 10 μM d'IUdR. Survie spécifique des cellules IUdR : 0,58.

Là encore la toxicité du rayonnement est accrue par la présence de l'IUdR au sein de la cellule puisque que la survie cellulaire est diminuée pour les cellules contenant de l'IUdR. Le facteur β , habituellement corrélé aux dommages sub-létaux, est proche de 0 pour les cellules contrôle ce qui laisse penser que la majorité des dommages de l'ADN engendrés par le rayonnement, induit rapidement la mort cellulaire.

Le DEF est dans ces conditions de 1,52 ($\text{Dose}_{10\%}(\text{contrôle}) = 6,72 \text{ Gy}$; $\text{Dose}_{10\%}(\text{IUdR}) = 4,41 \text{ Gy}$) et l'effet de radiosensibilisation de l'IUdR avec un rayonnement de haute énergie est donc confirmé. Le facteur imputable aux électrons Auger correspondant simplement au

ratio entre les 2 DEF est alors de 1,27. Ces résultats sont en accord avec les différentes études réalisées sur cette thématique qui sont récapitulées sur le Tableau 10.

Tableau 10 : Principaux paramètres des études portant sur la radiosensibilisation de l'IUdR *in vitro*.

Référence	Modèle tumoral	Concentration d'IUdR et temps d'exposition	Remplacement de la thymidine (%)	Taux de survie (%)	Energie du rayonnement	SER 10%	Facteur de contribution de l'effet photoélectrique
Nath, 1987	cellules de poumon d'hamster chinois (CHO)	10 μ M, 3 jours	18,1	100	250 kV 4 MV	3,2 2,2	1,5
Taverna, 2003	CHO	1 μ M, 1 jour 10 μ M, 1 jour	5 10	80 40	^{137}Cs (662 keV)	1,7 -	-
Lawrence, 1990	cellules de carcinomes humains de colon (HT29)	10 μ M, 1 jour	14	100	^{60}Co (1,25 MeV)	1,2	-
Shinohara, 1996	cellules HeLa	10 μ M, 18h	-	71	150 kVp ^{60}Co (1,25 MeV)	2,1 1,8	1,16
Dugas, 2010	cellules CHO	5 μ M, 27h 105 μ M, 27h 20 μ M, 27h	9,2 12 16,6	88 96	35 keV 4 MV	2 (9,2%) 1,5 (9,2%)	1,3
Miller, 1987	cellules de poumon d'hamster chinois (V79)	10 μ M, 17h	16	100	100 kVp 15 MV	2,2 2	1,1
Laster, 1993	cellules de poumon d'hamster chinois (V79)	10 μ M, 14h	17	92	33+ 33-	3,0 2,2	-
Notre étude	cellules de gliome de rat (F98)	10 μ M, 48h	9	58	50keV ^{60}Co (1,25 MeV)	1,93 1,52	1,27

III.B.2 Discussion

Concernant la photoactivation de l'IUdR avec un rayonnement de basse énergie, les précédents travaux rapportent des DEF variant de 2 à 3,2. La quantité d'IUdR est une source évidente des variations observées. L'énergie du rayonnement est également importante et deux études rapportent les variations du DEF autour du seuil K de l'iode (33,169 keV). Laster constate une augmentation du DEF de 2,2 à 3 selon que l'énergie utilisée soit en dessous ou au-dessus du seuil K de l'iode (Laster *et al.*, 1993). Le DEF est porté de 1,25 à 1,64 dans l'étude de Corde (Corde *et al.*, 2004) (Figure 64). Ceci s'explique par le fait que les photons ayant une énergie supérieure à 33,17 keV ont l'énergie suffisante pour arracher un électron de la couche la plus interne de l'atome d'iode. La probabilité d'interaction des photons augmente donc juste au-dessus du seuil K ce qui se matérialise par une augmentation des événements photoélectriques et donc une toxicité accrue du rayonnement sur les cellules. Enfin, un DEF de 2,6 est obtenu sur des cellules SQ20B exposées à l'IUdR dans les mêmes conditions que celles de cette étude et irradiées à 50 keV par Stéphanie Corde (Corde *et al.*, 2004). Les résultats de cette étude sont rapportés dans la Figure 64.

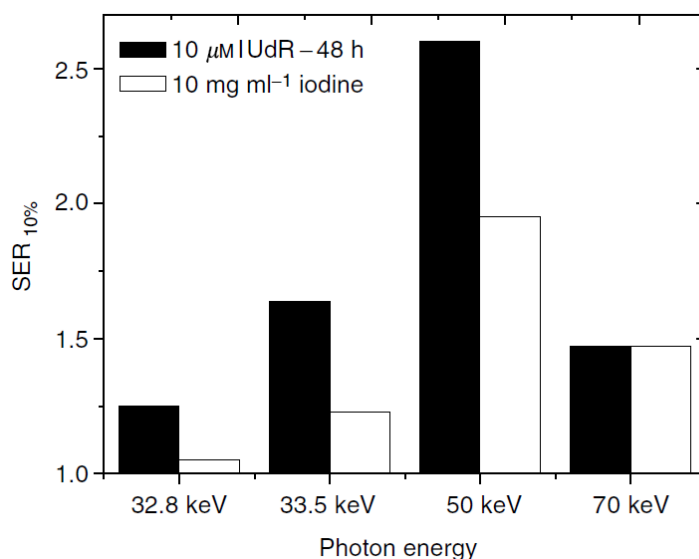


Figure 64 : Variation du SER_{10%} en fonction de l'énergie d'irradiation pour des cellules pré-incubées 48h avec de l'IUdR ou des cellules irradiées en présence d'ioméron (Corde *et al.*, 2004).

Ces différences observées pour différents types cellulaires mettent en avant l'influence du type cellulaire dans la réponse des cellules aux différents stress.

La radiosensibilité de l'IuDR a été évaluée avec différentes sources de rayonnement à hautes énergies, source de ^{60}Co , de ^{137}Cs et accélérateur linéaire et les DEF relevés varient de 1,2 (Lawrence *et al.*, 1990) à 2,2 (Nath *et al.*, 1987).

Enfin, le facteur attribuable aux effets photoélectriques observé lors des études de Miller et de Shinohara est légèrement plus faible que celui déterminé dans cette étude (Miller *et al.*, 1987; Shinohara *et al.*, 1996). L'étude de Nath rapporte un facteur considérablement plus important, qui peut être expliqué là encore par la plus grande quantité d'IuDR incorporée (Nath *et al.*, 1987). Enfin, l'étude de Dugas réalisée dans des conditions similaires aux nôtres, rapporte un facteur très semblable à celui que nous avons obtenu, les DEF obtenus pour les deux énergies d'irradiation sont également très similaires.

De nombreux paramètres influencent les résultats observés et les comparaisons sont délicates. La nature même du rayonnement, le débit de dose et enfin le type cellulaire peuvent notamment être à l'origine des différences observées. Toutefois, l'IuDR sensibilise les cellules F98 au rayonnement de haute énergie et de façon encore plus prononcée pour le rayonnement synchrotron, ceci est donc prometteur pour des essais précliniques.

La radiosensibilité de l'IuDR à un rayonnement de haute énergie est connue depuis de nombreuses années, mais les mécanismes exacts n'ont pas encore été élucidés. Deux mécanismes biologiques ont été proposés : une augmentation des dommages radio-induits, particulièrement des cassures simple et double brin de l'ADN et/ou des conséquences sur la vitesse de réparation des dommages sub-létaux (Cecchini *et al.*, 2005).

III.B.3 Mécanismes de radiosensibilité de l'IuDR

Un mécanisme de radiosensibilité a cependant été proposé dès les années 70 par Fornace et ses collaborateurs (Fornace *et al.*, 1990; Klyachko *et al.*, 1999). L'interaction de l'iodouracile avec un électron hydraté générerait un radical iode et un radical uracyl hautement réactif. Ce radical pourrait facilement arracher un atome d'hydrogène au 2'-désoxyribose voisin générant ainsi une cassure de l'ADN. Cette cassure, localisée sur le brin portant l'IuDR ou sur le brin complémentaire pourrait ensuite conduire à une DSB, qui suite à une réparation incorrecte ou un défaut de réparation induirait finalement la mort cellulaire.

III.B.4 Photoactivation de l'IUdR

La toxicité de l'IUdR lors de son association avec le rayonnement basse énergie est donc le résultat de la combinaison de l'effet photoélectrique et de la radiosensibilisation de l'IUdR. Les études cellulaires confirment en effet que l'utilisation d'un rayonnement de basse énergie améliore encore l'efficacité de l'IUdR par rapport à un rayonnement classique de radiothérapie (haute énergie). Le mécanisme de photoactivation est quant à lui défini par les événements physiques de l'effet du rayonnement et particulièrement par l'effet photoélectrique. Bien que la cible principale dans le cas présent soit clairement identifiée, la nature des dommages de l'ADN et les événements cellulaires induits ne sont pas encore clairement identifiés.

Pour déterminer si les ionisations induites par les 2 types de rayonnement pouvaient modifier la quantité de cassures des brins de l'ADN engendrée par les rayonnements seuls, une étude des cassures des brins de l'ADN a été réalisée aussi bien pour les cellules irradiées à haute énergie qu'à basse énergie.

III.C. Cassures des brins de l'ADN

III.C.1 Quantification des cassures des brins de l'ADN

Les cassures de l'ADN ont été quantifiées par la méthode des comètes pour toutes les conditions présentées ci-dessus. Afin de s'assurer de quantifier les dommages corrélés à la toxicité observée lors des tests de clonogénicité, ces études ont été réalisées sur les mêmes solutions cellulaires. Le test de comètes permet de quantifier les cassures simple-brin et double brins de l'ADN sans distinction. Chaque point correspond à la moyenne de deux expériences indépendantes.

Sur la Figure 65, sont représentés les moments de la queue de la comète en fonction de la dose d'irradiation pour des cellules pré-exposées ou non à l'IUdR et irradiées avec la source de ^{60}Co . Le moment de la queue de la comète (tail moment) tient compte à la fois du pourcentage d'ADN dans la queue (rapport entre l'intensité de la fluorescence dans la tête et celle dans la queue de la comète), mais aussi de la longueur de la queue de la comète.

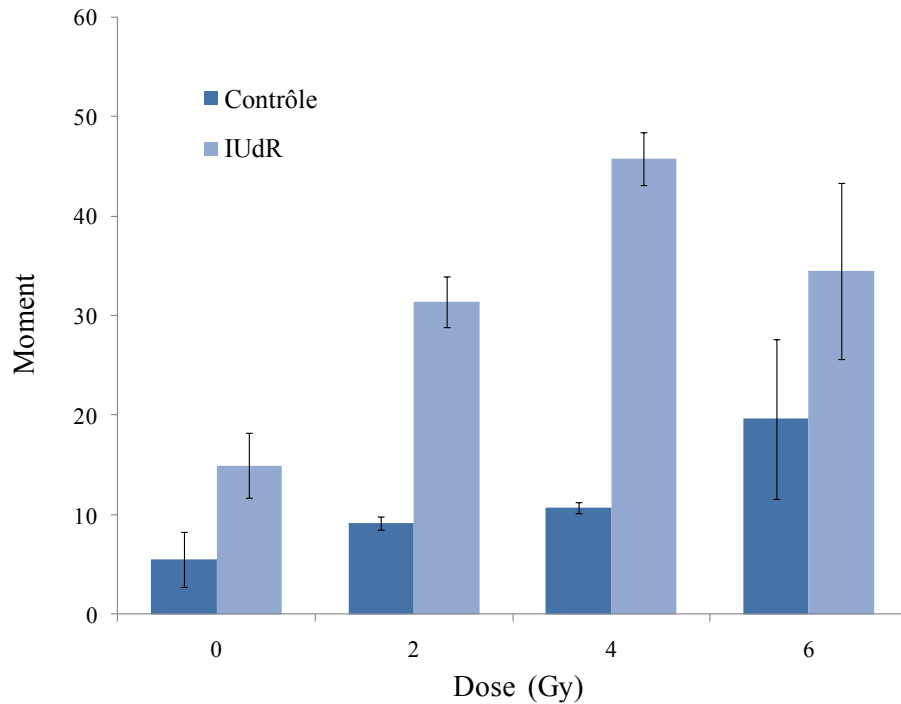


Figure 65 : Cassures de l'ADN dans les cellules F98 exposées à l'IUdR irradiées à 1,25 MeV.

On remarque que le nombre de cassures de l'ADN pour l'IUdR sans irradiation est plus important que pour les cellules contrôle. La quantité de cassures de l'ADN augmente avec la dose pour les cellules contrôle ainsi que pour les cellules contenant de l'IUdR.

L'augmentation du nombre de cassures de l'ADN pour les cellules contenant de l'IUdR par rapport aux cellules contrôle est bien corrélée avec la cytotoxicité particulière de l'IUdR sur le modèle F98, décrite ci-dessus. L'augmentation des cassures de l'ADN avec la dose est plus importante pour les cellules contenant de l'IUdR que pour les cellules contrôle et ceci même si la part de dommages attribuée à l'IUdR seul est soustraite. L'augmentation des cassures de l'ADN pourrait donc être, en partie, responsable de la sensibilisation des cellules au rayonnement de haute énergie par l'IUdR.

Ces résultats correspondent au phénomène de radiosensibilisation, il est intéressant d'observer les résultats obtenus pour les cellules irradiées à basses énergies.

La même expérience a été menée avec les cellules irradiées au synchrotron à 50 keV et les résultats sont reportés sur la Figure 66.

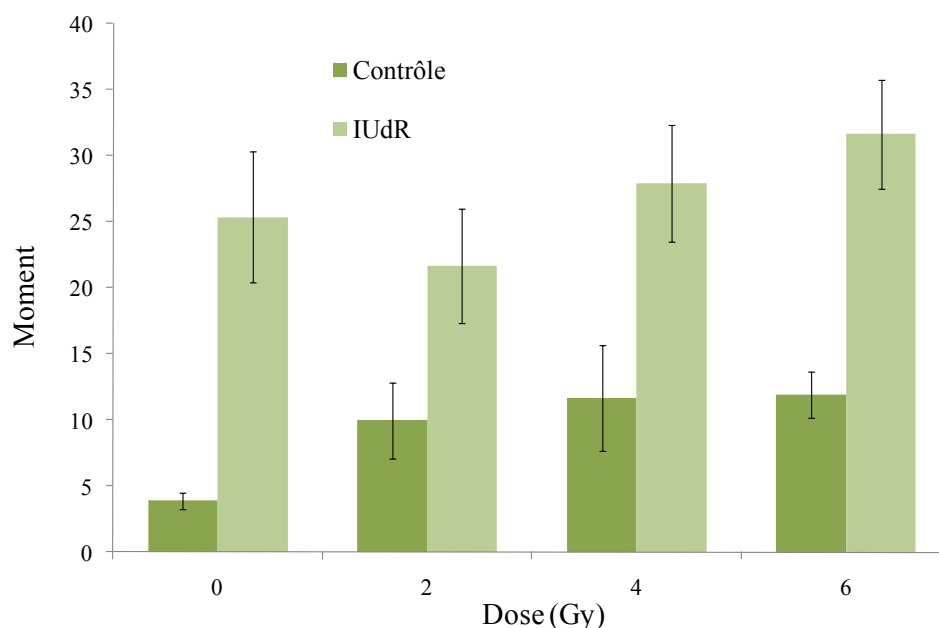


Figure 66 : Cassures de l'ADN dans les cellules F98 exposées à l'IUDR irradiées à 50 keV.

Le taux de cassures pour les cellules contenant l'IUDR est élevé par rapport à celui correspondant aux cellules contrôle. Concernant les cellules contrôle irradiées, des résultats comparables à ceux du rayonnement γ sont observés. Pour les cellules irradiées contenant de l'IUDR, la quantité de cassures augmente légèrement avec la dose. La méthode des comètes étant une méthode sensible et les cellules étant également des échantillons sensibles, nous ne comparerons que des conditions analysées lors de la même expérience.

Concernant le taux important de cassures de l'ADN observé suite à l'incubation des cellules avec 10 μM d'IUDR, il coïncide avec la toxicité importante observée.

L'absence d'augmentation du nombre de cassures dans les cellules exposées à l'IUDR et irradiées à 2 Gy pourrait être expliquée par la formation d'autres dommages de l'ADN tels que des pontages inter-brins et/ou des pontages ADN-protéines. En effet ces lésions n'induisent pas de variation de migration de l'ADN et la méthode des comètes ne permet donc pas de les distinguer.

D'autre part, les électrons Auger ont une énergie vraiment faible, qui est déposée autour de l'atome d'iode et dans un périmètre d'environ 10 paires de bases. En effet, le TEL de ces électrons est approximativement de 10 à 25 keV/ μm et leurs effets sont comparables à des particules α (Karnas *et al.*, 1999). Ces cascades d'électrons Auger entraînent donc des ionisations multiples et localisées sur l'ADN, ce qui laisse présager la formation de

dommages multiples localisés de l'ADN, or ces lésions ne sont pas non plus quantifiables par la méthode des comètes.

De même qu'aucune ou peu de toxicité propre à l'IUdR n'a été observée sur des cellules V79 exposées à 10 μ M d'IUdR pendant 17h (soit 16 % de remplacement de la thymidine), aucune augmentation de cassures de l'ADN qu'elles soient simples ou doubles n'est observée par Fornace (Fornace *et al.*, 1990; Kinsella *et al.*, 1987). Aucune augmentation de cassure de l'ADN suite à la seule présence d'IUdR au sein de l'ADN des cellules n'a été rapportée dans la littérature et ceci s'explique facilement par le fait que peu de types cellulaires présentent de sensibilité à l'IUdR.

Dans cette même étude de Fornace, une augmentation des SSB et des DSB est observée lors d'une irradiation de 7 ou 15 Gy à 15 MV de cellules exposées préalablement à l'IUdR. Une étude de 2001 menée par Karnas sur des cellules CHO souligne quant à elle qu'aucune DSB supplémentaire n'est observée pour les cellules irradiées par une source de ^{60}Co (35 Gy) dont 18% des thymidines de l'ADN sont remplacées par de l'IUdR (Karnas *et al.*, 2001). Pour le modèle F98, nous observons une augmentation des cassures de l'ADN pour les cellules contenant de l'IUdR et irradiées avec une source de ^{60}Co , sans pouvoir dissocier la nature simple ou double brin des cassures concernées.

Dans l'étude réalisée par Karnas, la présence d'IUdR dans les cellules contenant l'IUdR irradiées avec des rayons X de 100 kVp filtrés par du tungstène (spectre d'énergie entre 30 et 70 keV) induit une augmentation de la quantité des DSB (30,5 DSB/Gy à 34,1 DSB/Gy). Nous n'observons pas d'augmentation des cassures de l'ADN en présence d'IUdR dans les cellules irradiées à 50 keV. Ceci ne nous renseigne pas pour autant sur la variation des DSB de l'ADN puisque les DSB à un niveau basal sont environ 50 fois moins fréquentes que les SSB. Une augmentation des DSB peut donc ne pas être détectable par la méthode des comètes en élution alcaline.

III.C.2 Distribution des cassures de l'ADN

Les résultats de ces expériences peuvent également être présentés sous la forme d'histogramme de distribution sur lequel la proportion de cellules en fonction du pourcentage d'ADN dans la queue est reportée. Sur la Figure 67 est représenté l'histogramme pour des cellules irradiées à 50 keV, en présence ou non d'IUdR.

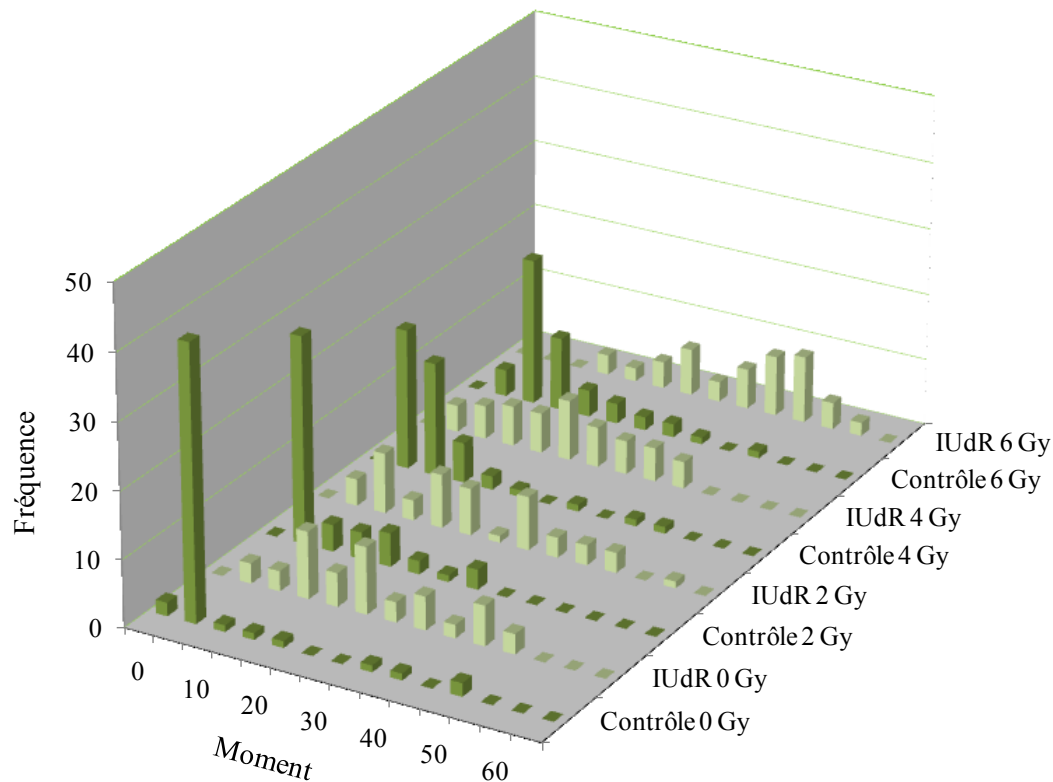


Figure 67 : Distribution des moments dans les cellules irradiées à 50 keV en présence ou non d'IUdR.

Alors que la distribution est homogène pour les cellules contrôle, la distribution des cellules contenant de l'IUdR est hétérogène. La seule présence de l'IUdR dans les cellules conduit déjà à une répartition hétérogène du taux de cassures par cellule. Il est cependant difficile de déterminer si l'augmentation globale des cassures provient d'une augmentation du nombre de cassures par cellule ou bien d'un plus grand nombre de cellules lésées. Concernant les cellules contrôle il semble néanmoins que ce soit l'augmentation du nombre de cassures de l'ADN par cellule qui soit à l'origine de l'augmentation du taux de cassures globale.

L'IUdR n'est pas incorporé dans l'ADN de toutes les cellules, il peut donc être supposé que les cellules présentant une quantité similaire de cassures à celles des cellules contrôle n'ont pas ou peu incorporé l'IUdR tandis que la présence de l'IUdR dans les cellules induirait une quantité importante de cassures.

La distribution des cassures des brins de l'ADN des cellules irradiées à 1,25 MeV en présence d'IUdR est représentée sur la Figure 68.

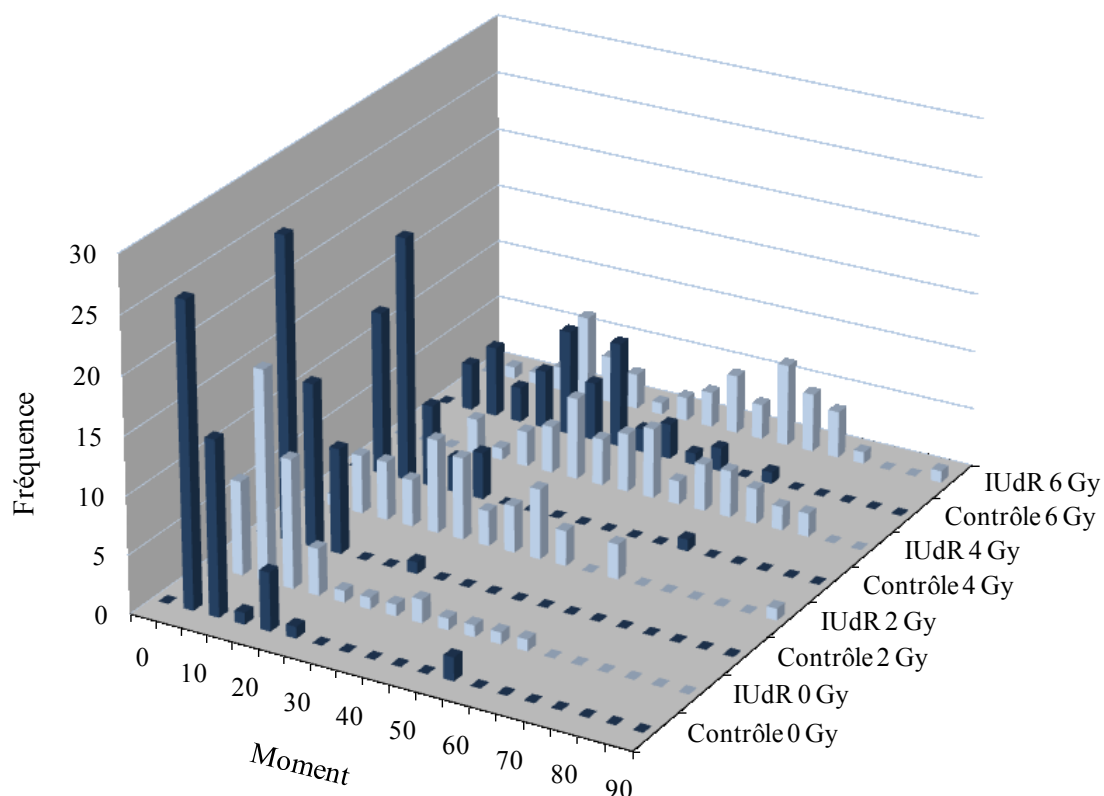


Figure 68 : Distribution des moments dans les cellules irradiées à 1,25 MeV en présence ou non d'IUdR.

Cette représentation de l'évolution des taux de cassures souligne encore l'effet radiosensibilisant de l'IUdR sur les cellules F98. Le taux de cassures par cellule contenant de l'IUdR augmente clairement avec la dose. La distribution des moments par cellule, pour les cellules IUdR à 6 Gy, présente clairement deux populations de cellules répondant différemment à l'irradiation et ceci peut certainement être corrélé à la quantité d'IUdR incorporée dans le noyau cellulaire.

En conclusion, ces travaux confirment l'effet de radiosensibilisation de l'IUdR avec un rayonnement de haute énergie et on observe un effet encore accru avec un rayonnement de basse énergie. La toxicité de l'IUdR seul sur le modèle F98 est cependant particulier, mais n'entrave en rien la radiosensibilisation ni la photoactivation de celui-ci puisque les résultats présentés ici sont en accord avec les études précédentes.

Concernant les cassures de l'ADN, la quantification de celles-ci nous permet de déterminer que la radiosensibilisation des cellules F98 par l'IUdR est notamment corrélée à une augmentation des cassures des brins de l'ADN tandis que d'autres dommages complexes paraissent être impliqués dans la photoactivation de l'IUdR.

IV. Ioméron, agent de contraste

L'effet photoélectrique comporte plusieurs phénomènes et si les électrons Auger et les photoélectrons sont responsables de la photoactivation de l'IUdR, l'augmentation de dose induit par l'ioméron est plutôt associée aux photoélectrons. L'ioméron fait partie des agents de contraste iodés utilisés lors d'examen clinique d'imagerie. C'est donc tout naturellement parmi cette famille de composés que l'on trouve les premiers agents iodés utilisés dans le cadre de la SSRT. Des résultats encourageants ont été obtenus lors d'études de survie *in vivo* sur des rats porteurs de gliomes F98 mais aucune étude de survie cellulaire sur le modèle F98 n'a été réalisée.

IV.A. Etude de survie cellulaire

Les cellules F98 ont donc été irradiées en solution avec 10 mg/ml en iode d'ioméron. Sur la Figure 69, les courbes de survie des cellules irradiées à 50 keV en présence ou non d'ioméron sont représentées.

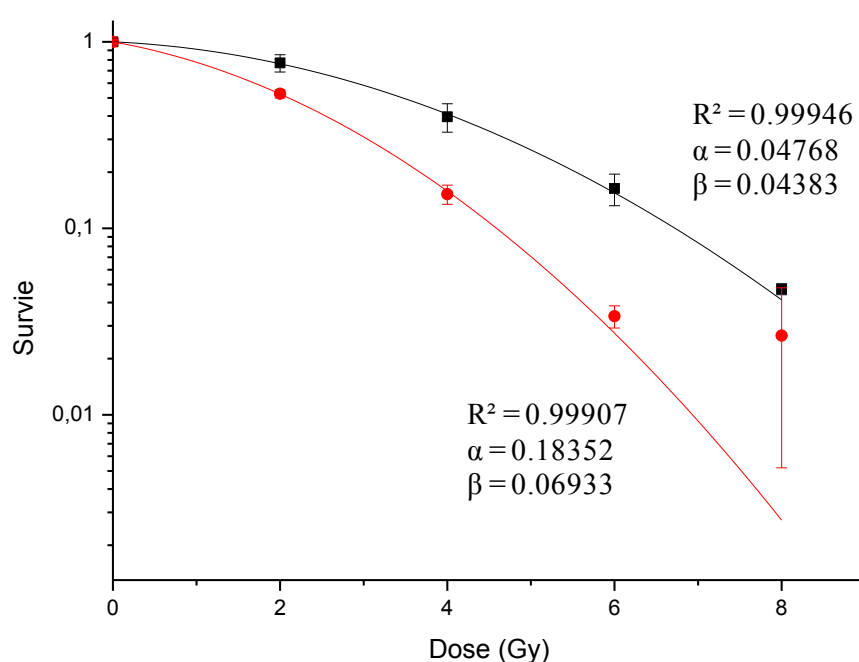


Figure 69 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV en l'absence (en noir) ou en présence de 10 mg/ml en iode d'ioméron (en rouge).

L'ioméron seul n'induit aucune toxicité cellulaire. Tout comme l'IUdR, il induit également une radiosensibilité au rayonnement de basses énergies des cellules F98. Un $DEF_{10\%}$ égal à 1,46 est déterminé à partir des résultats représentés ci-dessus ($dose_{10\%}(\text{contrôle}) = 6,72$; $dose_{10\%}(\text{ioméron}) = 4,59$).

Les cellules F98 se montrent plus résistantes à la sensibilité aux effets du rayonnement induite par l'ioméron, que les cellules SQ20B. En effet, l'étude similaire réalisée par Corde sur les cellules de carcinomes met en avant un DEF de 1,95 avec une $dose_{10\%}(\text{ioméron})$ de 3,3 Gy et une $dose_{10\%}(\text{contrôle})$ de 6,4 Gy, c'est donc la dose nécessaire pour obtenir 10% de survie en présence d'ioméron qui est différente (Corde *et al.*, 2004).

Ce composé n'est pas connu comme un radiosensibilisateur aux hautes énergies, tout l'effet observé avec le rayonnement synchrotron serait donc principalement dû aux effets photoélectriques.

Une expérience similaire a tout de même été réalisée avec un rayonnement de haute énergie (source de ^{60}Co) et les résultats sont représentés sur la Figure 70. Contrairement aux autres données pour lesquelles 3 expériences indépendantes ont été réalisées, la courbe concernant les cellules irradiées en présence d'iode correspond à la moyenne de deux expériences.

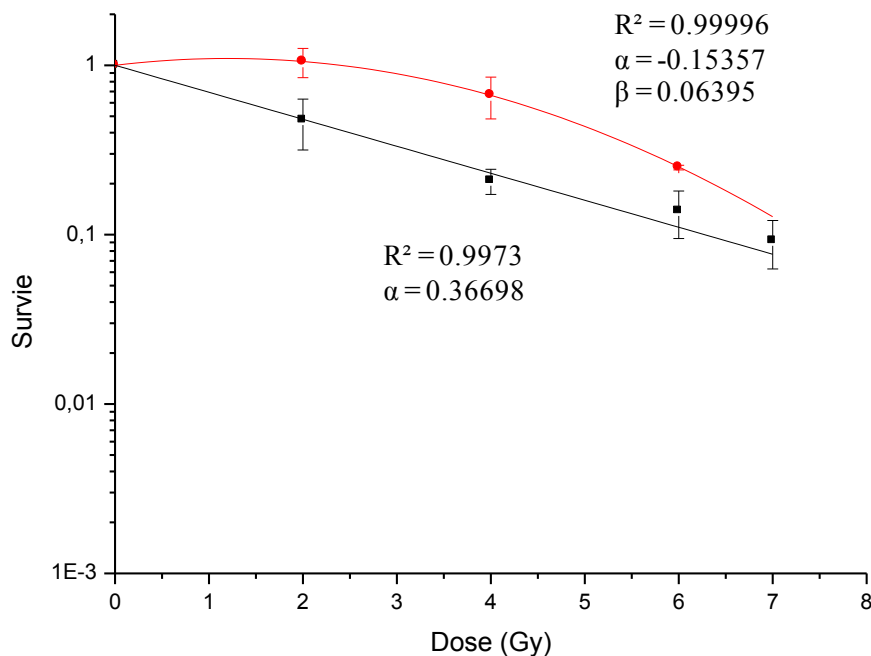


Figure 70 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 1,25 MeV en l'absence (en noir) ou en présence de 10 mg/ml en iode d'ioméron (en rouge).

La courbe noire correspond aux cellules irradiées sans ioméron et la courbe rouge à celles irradiées en présence d'ioméron. De façon étonnante, la présence de l'ioméron dans le milieu entraîne une diminution de la toxicité du rayonnement sur les cellules. A l'inverse de ce qui est observé à basses énergies avec le rayonnement synchrotron, il semble que l'ioméron ait un rôle protecteur des cellules pour une irradiation de hautes énergies. L'exemple le plus connu de composé protecteur est le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Shinohara *et al.*, 1996). Le DMSO est notamment employé pour déterminer la proportion d'effets indirects d'un rayonnement. L'effet direct d'un rayonnement est défini par une ionisation directe des molécules cibles, tandis que l'effet indirect est décrit comme l'ionisation de molécules d'eau (radiolyse de l'eau) ou de dioxygène générant des radicaux libres très réactifs. Le DMSO piège ces radicaux libres, ceux-ci n'induisent donc pas de dommages sur l'environnement cellulaire. De la même façon, on peut supposer que la quantité importante d'ioméron dans la solution cellulaire (10^{13} fois plus de molécules d'ioméron que de cellules) protège les cellules en réagissant avec une grande partie des radicaux générés par le rayonnement.

IV.B. Cassures des brins de l'ADN

Contrairement à l'IUdR, l'ioméron n'est pas au contact de l'ADN, il est tout même intéressant d'étudier les variations des taux de cassures de l'ADN radioinduites par la présence d'ioméron et ceci aussi bien pour le rayonnement synchrotron que pour le rayonnement γ , bien que les effets attendus soient différents.

Sur la Figure 71, sont représentés les moments de la queue de la comète en fonction de la dose d'irradiation à 50 keV.

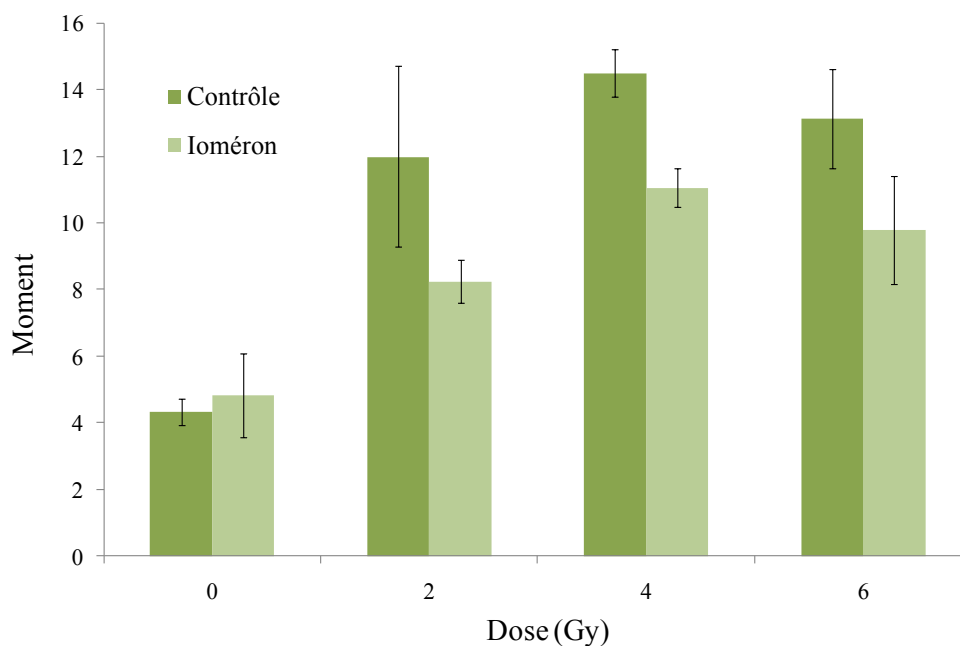


Figure 71 : Cassures de l'ADN dans les cellules F98 irradiées à 50 keV en présence d'ioméron (10 mg/ml en I).

Tout d'abord, la présence d'ioméron dans le milieu de culture n'entraîne pas d'augmentation du taux de cassures. Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, une diminution des cassures de l'ADN dans les cellules irradiées en présence d'ioméron est observée. Ceci peut provenir de la formation d'autres dommages complexes de l'ADN ou de la protection par l'ioméron, de l'ADN vis-à-vis des dommages radio-induits.

La distribution des cellules irradiées à 50 keV en présence d'ioméron est représentée sur la Figure 72.

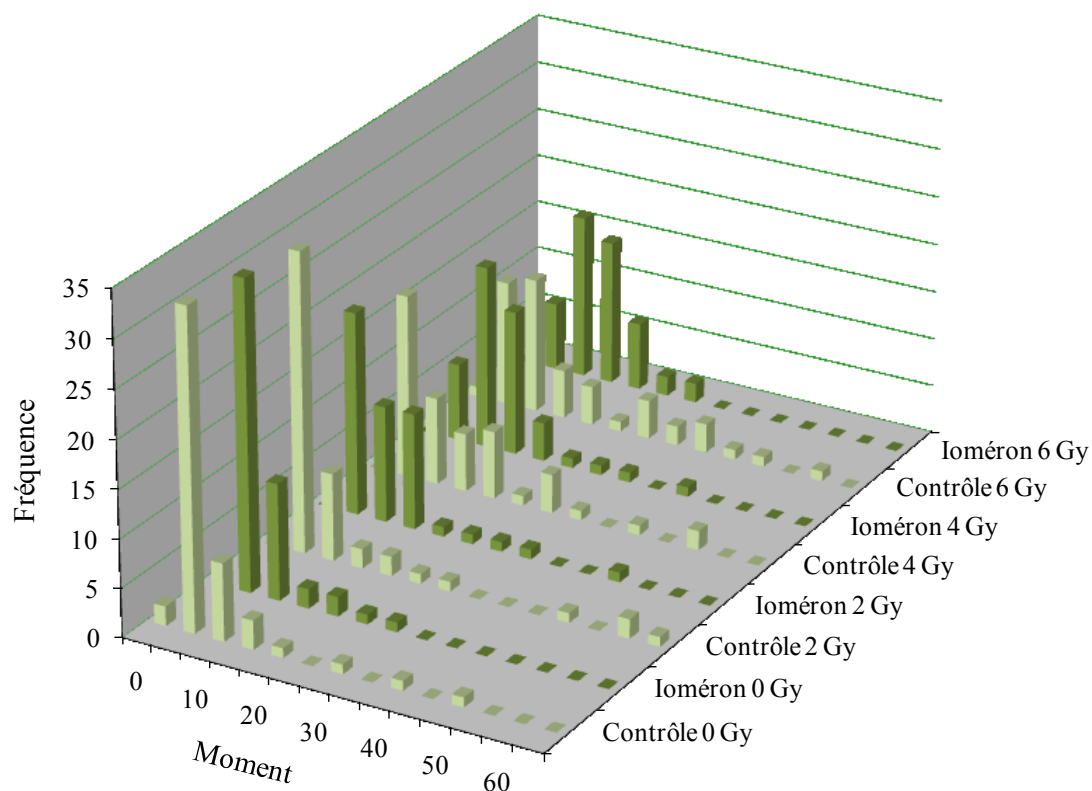


Figure 72 : Distribution des moments dans les cellules irradiées à 50 keV en présence ou non d'ioméron.

La distribution des cassures de l'ADN est homogène pour les cellules irradiées en présence d'ioméron. Même si l'augmentation est moins importante en présence d'ioméron, la quantité de cassures augmente toutefois avec la dose, et paraît provenir majoritairement d'une augmentation du nombre de cassures par cellule.

Alors que la présence d'ioméron protège les cellules du rayonnement γ , il est intéressant d'étudier l'influence de ce composé sur les taux de cassures de l'ADN induit par ce même rayonnement. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la Figure 73.

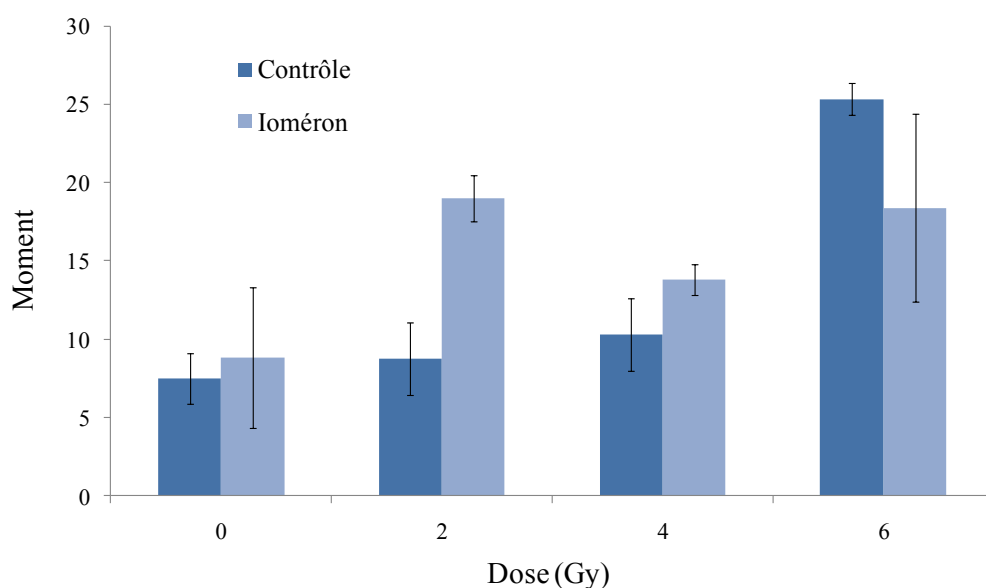


Figure 73 : Cassures de l'ADN dans les cellules F98 irradiées à 1,25 MeV en présence d'ioméron (10 mg/ml en I).

Au regard des résultats obtenus, aucune variation significative n'est observée et il est difficile de conclure sur ces résultats, qui mériteraient d'être répétés.

L'ioméron est donc un composé qui ne révèle aucune toxicité propre. Sa présence dans le milieu cellulaire permet une augmentation de la sensibilité des cellules aux rayonnements de basse énergie. L'absence d'une augmentation des dommages de l'ADN causée par le rayonnement lors de la photoactivation de l'ioméron, par rapport aux cellules irradiées sans ioméron laisse penser que d'autres dommages cellulaires entrent en jeu dans ce phénomène de sensibilité. Une augmentation de la létalité provenant de dommages de la membrane cytoplasmique peut être envisagée.

A l'inverse avec un rayonnement très énergétique, la présence d'ioméron dans le milieu de culture permet la protection des cellules irradiées.

V. Association de l'IuDR et de l'ioméron

L'association de plusieurs composés pourrait être une alternative thérapeutique, l'efficacité de l'association d'ioméron et d'IuDR avec un rayonnement synchrotron a donc été évaluée sur les cellules F98. Pour l'IuDR comme pour l'ioméron, les conditions utilisées sont identiques à celles de leur utilisation respective. Le résultat de cette association ainsi que ceux des composés utilisés séparément sont représentés sur la Figure 74.

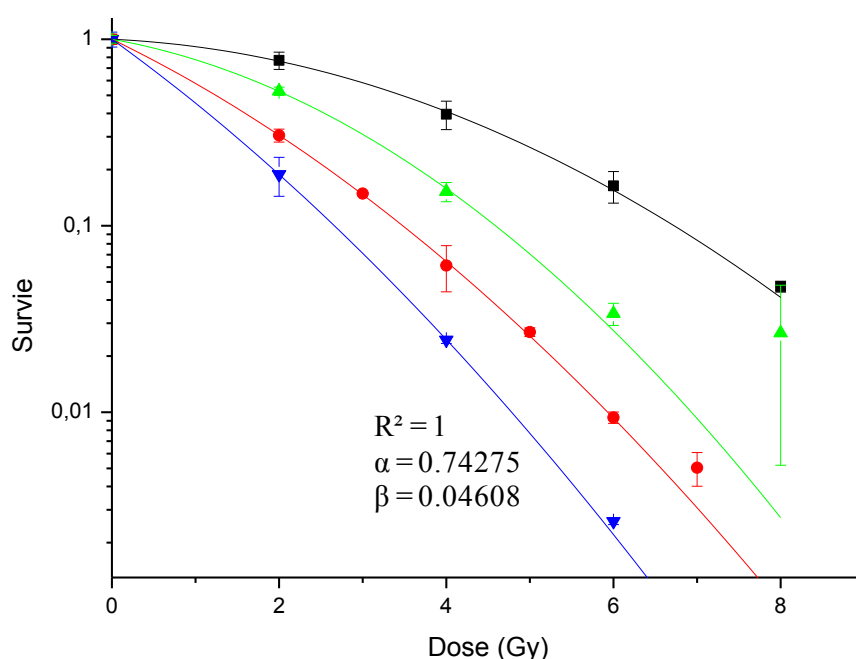


Figure 74 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV en présence d'ioméron à 10 mg/ml en I (triangle vert), de 10 μ M d'IuDR (rond rouge) et de l'association d'IuDR et d'ioméron (triangle bleu).

La courbe bleue correspond aux cellules contenant de l'IuDR et irradiées en présence d'ioméron à 50 keV. Le taux de survie cellulaire est encore diminué que ce soit par rapport aux cellules contrôle mais aussi par rapport aux cellules irradiées en présence d'iode. Le DEF déterminé est de 2,53. L'association est donc intéressante car il n'y a pas de saturation des effets, et ceux-ci sont encore augmentés.

Le facteur α de la courbe correspondante à l'association des composés est augmenté par rapport aux cellules contrôle, mais aussi par rapport aux deux composés iodés évalués séparément. Cette disparition de l'épaule de la courbe pour l'utilisation combinée des composés iodés indique que la majorité des dommages n'est pas réparée par la cellule. Au

regard des résultats obtenus lors des tests des comètes sur les cellules irradiées à 50 keV en présence d'IUdR ou d'ioméron, on peut supposer que la nature complexe et multiple des dommages induits par les cascades d'électrons Auger engendrées par la présence d'IUdR dans l'ADN, induit un défaut de réparation tandis que l'ioméron engendrerait simplement un surnombre de cassures de l'ADN ou des dommages aux membranes cellulaires. L'association de ces deux effets est ainsi plus létale que chaque effet pris indépendamment.

VI. Conclusion

La radiosensibilisation de l'IUdR avec un rayonnement de haute énergie est confirmée sur le modèle F98 et la protection des cellules par l'ioméron pour cette même irradiation a été mise en avant.

La photoactivation de l'IUdR et celle de l'ioméron se sont révélées efficaces pour augmenter la toxicité du rayonnement synchrotron sur ce modèle de gliome, et différents mécanismes de toxicité par l'étude des cassures des brins de l'ADN ont été mis en avant et corrélés aux événements physiques primaires que sont les cascades d'électrons Auger au sein de l'ADN pour l'IUdR et les photoélectrons en ce qui concerne l'ioméron.

L'ioméron a déjà donné des résultats intéressants en SSRT, et les résultats obtenus lors de l'association de l'IUdR avec un rayonnement monochromatique de 50 keV sur le modèle de cellule F98 sont encourageants. Cette association a déjà été évaluée dans le cadre d'essais précliniques de SSRT. En effet, Julia Rousseau lors de sa thèse (Rousseau *et al.*, 2009a) a réalisé un essai de thérapie par photoactivation de l'IUdR avec un rayonnement synchrotron monochromatique de 50 keV sur des rats porteurs de gliomes F98. L'IUdR est diffusé pendant 6 jours (de J7 à J13) grâce à des pompes osmotiques et permet une amélioration significative de la survie des rats (Figure 75). Les rats irradiés à J14 à 50 keV présentent également une survie plus longue. La combinaison de l'IUdR avec le rayonnement n'apporte malheureusement pas d'augmentation significative de la survie des rats par rapport aux traitements indépendants.

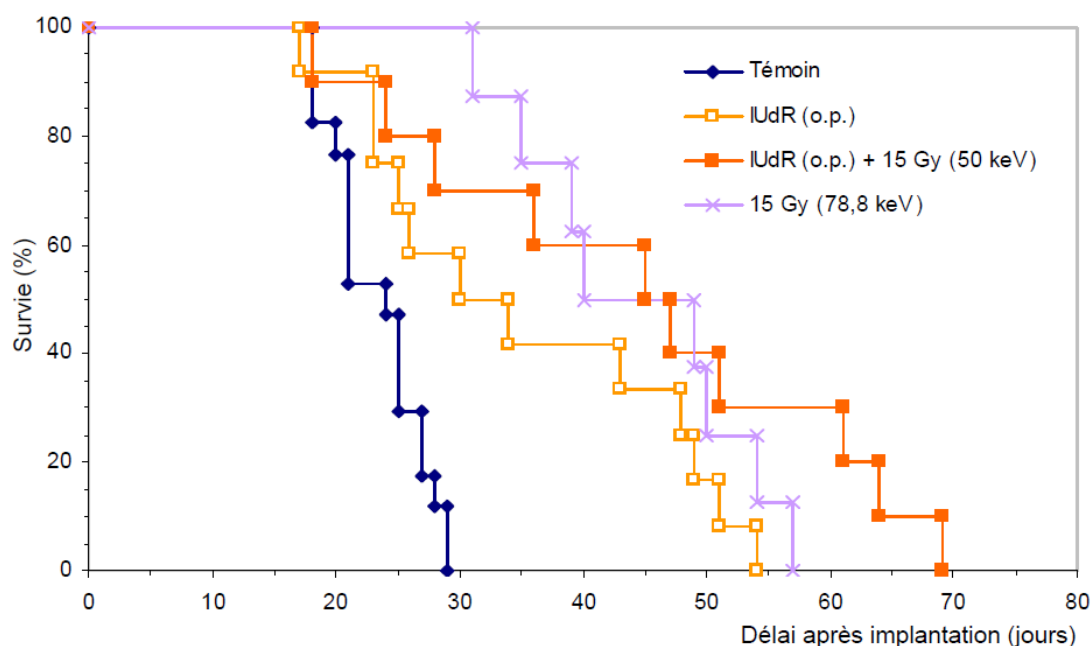


Figure 75 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliomes F98 traités par : irradiation de 15 Gy à 78,8 keV, injection d'IUDR par pompe osmotique, ou injection d'IUDR par pompe osmotique suivie d'une irradiation de 15 Gy à 50 keV (Rousseau, 2007).

La quantité d'iode dans les différentes zones du cerveau du rat a été évaluée par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry). La quantité maximale d'iode a été trouvée dans la zone tumorale, la concentration était de $35,7 \mu\text{g/g}$ de tissu sec. Une analyse par NanoSIMS (Nanoscale Secondary-Ion Mass Spectrometry) a permis de localiser l'iode uniquement dans le noyau et plus particulièrement dans la chromatine condensée localisée sur la membrane nucléaire interne.

Bien que le traitement combiné n'ait pas montré d'efficacité thérapeutique lors de cet essai, plusieurs paramètres restent à évaluer et optimiser en vue d'obtenir de meilleurs résultats. La quantification du taux d'incorporation d'IUDR dans les cellules tumorales ainsi que le dénombrement des cellules ayant incorporé l'IUDR pourrait être évalué et amélioré. En effet, *in vitro* les cellules F98 semblent incorporées moins d'IUDR que les autres types cellulaires, déterminer ce taux *in vivo* semble donc particulièrement intéressant.

Une technique d'immunomarquage utilisant un anticorps anti-IUDR lié à un anticorps secondaire couplé à un fluorophore permet la détection de l'IUDR dans des cellules ou dans des tissus. Ce marquage a été utilisé pour quantifier le nombre de cellules contenant de l'IUDR dans l'étude de Rodriguez. Il renseigne sur le taux et la cinétique d'incorporation d'IUDR dans des souris porteuses de tumeurs sous-cutanée (Rodriguez *et al.*, 1994). La cinétique d'augmentation du nombre de cellules contenant de l'IUDR en fonction du temps

d'exposition à l'IUdR prend une forme exponentielle. Un maximum de 94% de cellules marquées est atteint après 120h d'exposition, ce qui correspond approximativement à 5 temps de doublement des cellules. C'est également après 120h d'exposition que le taux de remplacement de la thymidine atteint un maximum de 2%.

Le temps de doublement des tumeurs F98 semble être plus important, de l'ordre de 60h (Yang *et al.*, 2005), que celui des tumeurs de l'étude de Rodriguez (environ 25h) ce qui laisse penser que l'injection de l'IUdR devrait être encore prolongée. Une étude réalisée en 1992 sur 4 patients atteints de gliomes de haut grade rapporte le taux de cellules marquées et le taux de remplacement de la thymidine après 3 à 7 jours d'infusion d'IUdR (Cook *et al.*, 1992). Les tissus sur lesquels sont réalisées les analyses sont obtenus lors de la résection chirurgicale. Le taux de cellules varie de 6 à 21% pour 3 des 4 patients et est égal à 65% pour le 4^{ème} tandis que pour les patients atteints de cancer tête et cou les taux oscillent entre 63 et 80% de cellules marquées pour des temps d'exposition similaires. Les taux de remplacement de thymidine corrigés par les taux de cellules marquées sont compris entre 0 et 4% alors que ceux des autres tumeurs considérées varient entre 3 et 9%.

L'injection d'IUdR prolongée est donc indispensable pour une incorporation efficace sur plusieurs divisions cellulaires et une simple injection intraveineuse paraît dérisoire au regard du peu de stabilité de l'IUdR dans la circulation sanguine (déhalogénéation et déglycosylation). Plusieurs modes d'injection ont donc été développés en vue de l'incorporation de l'IUdR pour le traitement de tumeurs cérébrales. Outre les pompes osmotiques présentées ici, des liposomes et des polymères ont été proposés pour une libération efficace de l'agent. En 1998, Williams propose des polymères biodégradables d'IUdR comme procédé de libération continu de l'agent (Williams *et al.*, 1998). Ces polymères qui libèrent l'agent pendant environ 5 jours, sont placés sur le site d'injection des cellules tumorales, et 4 ou 8 jours après l'insertion du polymère, environ 34% des cellules sont marquées par les anticorps. La persistance du marquage à 8 jours suggère une rétention locale de l'IUdR après sa libération. Une étude d'Harrington a consisté à évaluer l'efficacité d'un dérivé lipophile d'IUdR encapsulé dans des liposomes associé à une irradiation au ^{137}Cs . Ils ont montré que l'effet thérapeutique d'une fraction de 4,5 Gy sur des souris porteuses de xénogreffes était amélioré par l'injection prolongée des liposomes pendant 7 jours (Harrington *et al.*, 2004).

Deutsch a rapporté une étude portant sur le traitement de rats porteurs de gliomes 9L par une infusion d'IUdR grâce à des pompes osmotiques combinée à une irradiation X de 4 MV. Une faible et non significative augmentation de la médiane de survie des animaux

traités par l'IUdR seul ou par la radiothérapie, comparé avec les animaux non traités est relevée. La combinaison des 2 traitements augmente significativement la survie des rats.

Enfin, les travaux de Doiron, suggèrent que le fractionnement de la dose combiné avec l'IUdR permettrait une augmentation de la survie des animaux traités (Doiron *et al.*, 1999). En effet ces travaux portent sur des souris porteuses de tumeurs traitées par des polymères de BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) et irradiées avec des rayons γ . Aucune amélioration de la survie n'est observée lorsqu'une seule fraction d'irradiation est délivrée, mais si 5 fractions sont combinées au BrdU, la médiane de survie augmente et de façon encore plus considérable lorsque 10 fractions sont délivrées. Le BrdU est un analogue de l'IUdR, et son efficacité en combinaison avec un rayonnement de haute énergie fractionné laisse penser que l'IUdR combiné avec un rayonnement de basses énergies fractionné permettrait d'observer une amélioration de la survie puisque les conséquences des effets photoélectriques viendraient s'ajouter à ceux des effets de la radionsensibilisation des tissus par l'IUdR.

L'IUdR peut induire des électrons Auger lors de 2 processus différents : lors de l'irradiation de l' $^{127}\text{IUdR}$ stable avec un rayonnement basse énergie ou lors de l'utilisation d' $^{125}\text{IUdR}$ radioactif. L' ^{125}I ode est utilisé depuis de nombreuses années en diagnostic mais aussi en thérapie. Kassis et ses collaborateurs ont comparé l'efficacité d'une infusion prolongée d'un radioisotope de l'IUdR : $^{125}\text{IUdR}$ et de l' $^{127}\text{IUdR}$ stable sur des rats porteurs de gliome 9L (Kassis *et al.*, 1998). Comme décrit précédemment les pompes osmotiques permettent la diffusion du produit pendant 7 jours. Une augmentation modeste de la médiane de survie des animaux traités par l' $^{125}\text{IUdR}$ est observée (médiane de survie portée de 24 ($^{127}\text{IUdR}$) à 28,5 jours ($^{125}\text{IUdR}$)). Néanmoins environ 10% des animaux traités par l'iode radioactif vivent plus de 65 jours et sont considérés comme guéris alors que les animaux traités par l'iode froid ne vivent pas plus de 27 jours.

L'inconvénient majeur de cette méthode de traitement est que toutes les cellules ayant incorporées de l'IUdR en subissent la toxicité alors que la combinaison d'IUdR stable et de rayonnement permet de photoactiver le composé iodé avec un volume de distribution déterminé. De plus, l'utilisation d'iode " froid " associé à un rayonnement de basse énergie permet d'éviter certaines limitations dues à l'emploi d'iode radioactif.

En conclusion, une optimisation de la cinétique d'incorporation de l'IUdR et une injection continue d'IUdR associée à une irradiation fractionnée par un rayonnement monochromatique fixé à 50 keV semble être un traitement prometteur pour les gliomes de

haut grade et devrait permettre d'obtenir des résultats concluants sur ce modèle agressif de gliome F98.

Chapitre 3

Photoactivation de nanoparticules d'or dans le cadre de la SSRT

I. Contexte de l'étude

Les études concernant les nanoparticules d'or (NPo) sont en plein essor depuis quelques années. Ces composés, que l'on peut définir comme un assemblage d'atomes d'or de degré d'oxydation 0 formant un composé de taille nanométrique, sont présents ou développés dans de nombreux domaines. Dans ce chapitre, quelques applications médicales des NPo seront développées.

Tout d'abord, la stabilité d'une solution colloïdale de nanoparticules d'or est assez précaire surtout en milieu salin, c'est pourquoi plusieurs de ces nanoparticules sont composées d'un cœur d'atomes d'or et de molécules absorbées à sa surface. Ce procédé permet notamment d'améliorer la stabilité des nanoparticules *in vivo* et d'éviter l'opsonisation des nanoparticules. Les opsonines sont des protéines qui s'agglomèrent à la surface des corps étrangers afin d'être reconnues par des récepteurs cellulaires qui phagocytent la particule. La fonctionnalisation, en diminuant la probabilité de phagocytose, prolonge la circulation des nanoparticules dans le sang. Les composés adsorbés à la surface des NPo dans ce but, sont en grande majorité des polymères biocompatibles et hydrophiles tels que la polylysine et le polyéthylène glycol (PEG). La fonctionnalisation de la surface peut également permettre la conjugaison des NPo à des ligands et/ou la pénétration dans le cytoplasme ou même le noyau. La vectorisation des NPo pourrait, en outre, conduire au ciblage des cellules tumorales.

I.A. Applications thérapeutiques

En conséquence des multiples propriétés des NPo, les applications thérapeutiques sont variées. Ici seront abordés l'apport des NPo pour la photothermie et le traitement de l'angiogenèse, mais elles ont également un intérêt, et non des moindres, dans le diagnostic et la vectorisation des drogues.

La thérapie par hyperthermie consiste à chauffer des tissus afin de les détruire. Un laser est utilisé et des composés photothermiques peuvent être associés afin de diminuer la puissance de laser tout en ayant un effet important autour des composés photothermiques. Les avantages des NPo pour cette technique résident dans le fait qu'elles ont une grande section efficace d'absorption requérant donc une énergie d'irradiation minimale ; de plus elles sont considérées comme non toxiques. L'irradiation des NPo est suivie par une conversion rapide de l'énergie lumineuse en chaleur (environ 1 ps). L'utilisation des NPo en clinique requiert toutefois d'acquérir des informations complémentaires. Cette technique, utilisée dans le traitement des cancers, reste très confidentielle par rapport à la radiothérapie (Boisselier and Astruc, 2009).

Comme on l'a vu précédemment, l'angiogénèse tient un rôle important dans le développement tumoral. Or Mukherjee a montré *in vivo* que les NPo inhibent l'angiogénèse, par liaison avec un facteur de croissance liant l'héparine, ce qui inhibe ensuite la signalisation relayée par ces facteurs (Bhattacharya and Mukherjee, 2008). Les NPo sont utilisées depuis longtemps comme traitement contre la polyarthrite rhumatoïde, et là encore l'effet des nanoparticules sur l'angiogénèse paraît jouer un rôle important, puisque celle-ci joue un rôle clé dans la formation et le maintien de la maladie (Boisselier and Astruc, 2009).

La vectorisation de drogues est aussi un domaine dans lesquelles les NPo sont développées puisque la fonctionnalisation de la surface par des ligands permet d'ajouter des molécules aussi variées que des citrates, des amines, des acides nucléiques, des peptides, des anticorps, des lipides et même des agents de chimiothérapie tel que l'oxaliplatine (Brown *et al.*, 2010; Giljohann *et al.*, 2010).

I.B. Photoactivation des NPo

Même si l'or est un composé étudié depuis longtemps, ce n'est que depuis peu de temps que l'intérêt pour les NPo se développe. La première étude qui tient lieu de référence dans le domaine de la radiosensibilisation des NPo est celle d'Hainfeld en 2004, qui a mis en avant l'intérêt de la photoactivation des NPo dans le traitement par radiothérapie des tumeurs (Hainfeld *et al.*, 2004). Le traitement de souris, porteuses de tumeurs (carcinomes) sous-cutanées, par une injection intraveineuse de NPo de 1,9 nm suivie d'une irradiation de 26 Gy à 250 kVp montre des résultats intéressants puisque selon la quantité d'Au injectée (1,35 et 2,7 g Au/kg), 50 et 86% des animaux sont toujours en vie un an après l'implantation des tumeurs (Figure 76) alors que tous les témoins décèdent en moins d'une dizaine de jours.

D'autre part, une étude préalable sur des souris saines a permis de conclure que l'injection systémique des NPo (10 μ l/g de poids de souris) n'induit aucune toxicité pour les animaux.

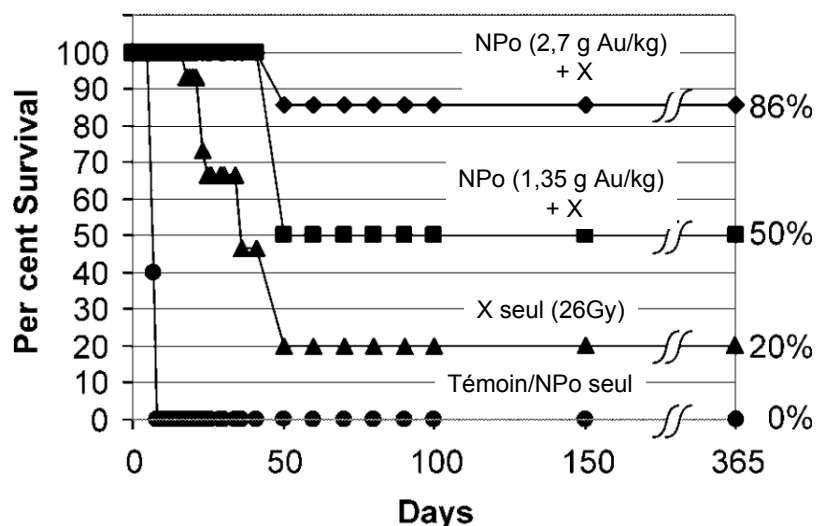


Figure 76 : Survie des souris porteuses de tumeurs sous cutanée, exposées aux différents traitements (Hainfeld *et al.*, 2004).

La seconde et la seule autre expérience réalisée sur le sujet a été menée par Chang. Le potentiel radiosensibilisateur de nanoparticules d'or de 13 nm est, cette fois, évalué à la fois lors d'études *in cellulo* et *in vivo*. Là encore le modèle choisi est une tumeur (mélanome) positionnée en sous cutanée. L'injection intraveineuse des NPo (1 g d' Au/kg) est suivie d'une irradiation de 25 Gy par un faisceau d'électrons de 6 MV. Ce traitement permet une nette diminution de la croissance du volume tumoral et une faible augmentation de la médiane de survie par rapport aux animaux irradiés (Chang *et al.*, 2008). Ces résultats sont toutefois beaucoup moins concluants que ceux observés lors de l'étude d'Hainfeld, probablement parce que la quantité de NPo était relativement assez faible.

Si peu de travaux rapportent la photoactivation des NPo comme thérapie anticancéreuse, plusieurs études concernant la radiosensibilisation des cellules par différents rayonnements ont été publiées depuis peu. Afin de simplifier l'analyse et de comparer ces études, les principaux paramètres de chaque expérience sont recensés dans le Tableau 11.

Ces études, de par la grande diversité des conditions expérimentales (taille, fonctionnalisation...) sont difficilement comparables entre elles. Des informations intéressantes, communes aux différents travaux permettent d'en apprendre davantage sur le

fonctionnement des nanoparticules. Tout d'abord, la localisation intracellulaire des NPo a été étudiée et quelles que soient leurs tailles (de 1,9 à 74 nm) elles sont trouvées être situées dans le cytoplasme. La quantification des NPo internalisées est proposée par Kong et Chithrani, et sera rapportée par la suite. Même si pour certaines études, des informations comme la cytotoxicité des NPo ou la présence des NPo durant l'irradiation manquent, la radiosensibilisation des NPo avec les rayonnements de basses énergies est incontestablement rapportée par tous les travaux, tandis que les résultats concernant les rayonnements de hautes énergies sont plus partagés.

Les études sont maintenant considérées de façon indépendante afin de décrire les autres informations rapportées qui nous renseignent sur le comportement de ces NPo.

L'étude de Chang est centrée sur le modèle animal et non sur le modèle cellulaire, une courbe rapporte cependant une assez faible radiosensibilisation des cellules exposées aux NPo après irradiation avec un faisceau d'électrons de 6 MV. Lors de cette étude les NPo ont été trouvées être localisées dans le cytoplasme et plus particulièrement dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique du cytoplasme (Chang *et al.*, 2008).

Outre la radiosensibilité des nanoparticules, Kong s'est également intéressé à la localisation et la quantification des NPo dans la cellule en développant des NPo fonctionnalisées. Les NPo fonctionnalisées avec le thioglucose sont distribuées dans le cytoplasme à une hauteur de $2,96.10^4$ NPo par cellule, alors que les NPo nues sont trouvées en moindre proportion $7,34.10^3$ par cellule, cette internalisation conséquente peut être expliquée par le fait que le glucose est un nutriment essentiel au métabolisme cellulaire. Les NPo fonctionnalisées avec la cystéamine se lient à la membrane cellulaire par interaction électrostatique et leur quantité atteint $1,2.10^5$ NPo par cellule. Concernant la radiosensibilité des NPo, celles-ci n'induisent aucun effet pour les rayonnements γ alors qu'une augmentation de la cytotoxicité de 63% pour les nanoparticules liées au glucose et de 32% pour celles liées à la cystéamine est observée suite à une irradiation à 200 kVp. Ces résultats sont obtenus pour une quantité intracellulaire de NPo identique, ce qui laisse penser que la localisation (cytoplasme ou membrane) des nanoparticules au sein même de la cellule est un facteur important dans la radiosensibilité. Ces résultats illustrent bien l'importance de l'effet photoélectrique et donc d'un rayonnement de basse énergie dans l'induction de la radiosensibilité par les éléments lourds.

Tableau 11 : Principaux paramètres des études portant sur la radiosensibilisation des NPo *in vitro*.

Référence	Modèle tumoral	Diamètre des NPo Etat de surface	Traitement	Test	Localisation des Npo	Toxicité des Npo seules	Qualité du rayonnement	Radiosensibilité
Chang, 2008	B16F10 (mélanome murin)	13 nm citrate	10 nM pendant 18h	- clonogénique	appareil de Golgi et réticulum endoplasmique	-	- électrons, 6MV	oui, très faible
Kong, 2008	MCF-7 (adénocarcinome humain du sein)	1,9 nm cystéamine	3,85 nM pendant 2h	- clonogénique	lié à la membrane cellulaire	non	- rayons X, 200 kVp	oui
	MCF-10A (cellules du sein)	1,9 nm thiogluucose	15 nM pendant 2h	- clonogénique - MTT	cytoplasme	faible	- rayons gamma, 0,66 et 1,25 MeV	non
Rahman, 2009	BAECs (cellule endothéliale d'aorte bovine)	1,9 nm - (Nanoprobes)	0,25 ; 0,5 et 1 mM pendant 24h et pendant l'irradiation	- méthode colorimétrique	cytoplasme	oui	- rayons X, 80 et 150 kVp	oui
							- électrons, 6 et 12 MeV	oui
Liu, 2010	EMT-6 (carcinome murin du sein)	6,1 nm PEG	300 µl à 0,4; 0,5 ou 1 mM pendant 48h	- clonogénique - MTT - γ-H2AX	-	non	- rayons X, 6,5 keV, 6 MV, 45 et 160 kVp - protons, 3 MeV	
	(adénocarcinome colorectal de souris)							
Butterworth, 2010	7 lignées différentes	1,9 nm - (Nanoprobes)	10 et 100 µg/ml pendant 1h et pendant l'irradiation	- clonogénique - γ-H2AX	-	varie selon le type cellulaire	- rayons X, 160 kVp	oui pour certaines lignées mais très faible
Chithrani, 2010	HeLa (carcinome du col de l'utérus)	14, 50 et 74 nm protéine de sérum	7.10 ⁹ NPo/ml pendant 27h et pendant l'irradiation	- clonogénique - γ-H2AX	cytoplasme, près de la membrane nucléaire	-	- rayons X, 105 et 220 kVp	oui
							- rayons X 6MeV, - ¹³⁷ Cs, 660 keV	oui, très faible

Enfin, les cellules cancéreuses et saines du sein incorporent la même quantité de NPo-glucose, pourtant un effet de radiosensibilisation d'environ 40% (augmentation de la toxicité) est obtenu pour les cellules cancéreuses alors qu'aucun effet n'est observé pour les cellules saines, ce qui pousse les auteurs à conclure que la radiosensibilisation n'est pas seulement due aux interactions physiques, mais qu'un mécanisme cellulaire complexe est également à prendre en compte (Kong *et al.*, 2008). L'étude de Rahman révèle la présence des NPo de 1,9 nm dans le cytoplasme. La radiosensibilité des NPo est mise en avant pour tous les rayonnements étudiés : rayons X de 80 et 150 kVp et faisceaux d'électrons de 6 et 12 MeV. Les SER ne seront pas reportés ici car ils sont déterminés pour la survie à 90% ce qui ne permet de les comparer avec les autres études (Rahman *et al.*, 2009).

Lors de l'étude de Liu, la radiosensibilité de NPo fonctionnalisées avec du polyéthylène glycol est évaluée suite à l'irradiation de cellules par une vaste gamme d'énergies de rayonnements : rayons X de 6,5 keV à 6 MV et protons de 3 MV. Une sensibilisation est observée pour les différentes énergies de rayons X, mais les cellules n'étant pas incubées avec la même concentration d'or, aucune comparaison ne peut être faite. L'expérience de la quantification des DSB par le test d'immunofluorescence des H₂AX permet d'observer une augmentation des DSB de l'ADN suite à l'irradiation en présence d'or (Liu *et al.*, 2010).

Butterworth présente une étude de cytotoxicité et radiosensibilité des NPo de 1,9 nm sur plusieurs lignées cellulaires et un rayonnement de basses énergies (160 kVp). La réponse des cellules exposées à 10 ou 100 µg de NPo/ml varie selon la nature des cellules, de 75 à 100% de survie pour la plus faible concentration de NPo et de 45 à 80% pour la plus haute. En termes de radiosensibilisation des NPo avec un rayonnement de 160 kVp, les SER varient également selon la nature des cellules considérées. Si pour certaines lignées aucune sensibilité n'est observée, un SER allant jusqu'à 2 est obtenu pour des fibroblastes humains primaires. Le SER déterminé dans cette étude est calculé pour la survie obtenue après une irradiation de 2 Gy (soit entre 40 et 90% de survie) contrairement au SER à 10% utilisé couramment (Butterworth *et al.*, 2010).

L'étude de Chithrani quant à elle porte sur l'influence de la taille des NPo lors de l'internalisation de celles-ci et sur la sensibilité aux rayonnements. Les 3 diamètres de NPo étudiées sont 14, 50 et 74 nm. Celles de 50 nm montrent une plus grande incorporation dans les cellules avec $6 \cdot 10^3$ NPo par cellule après une exposition de 8h à $1 \cdot 10^9$ NPo/ml alors que les

concentrations de celles de 74 et 14 nm s'élèvent à 3.10^3 et $1,4.10^3$ NPo par cellule respectivement. Les NPo sont localisées dans des petites vésicules d'environ 300 à 500 nm, à proximité de la membrane nucléaire.

Pour quantifier la sensibilité aux rayonnements induite par les NPo, les cellules sont d'abord incubées avec 7.10^9 NPo/ml pendant 24h, puis après le rinçage des boîtes de culture une solution de nanoparticules de même concentration est ajoutée afin de maintenir une concentration identique en NPo dans le milieu pendant l'irradiation. Les cellules ayant internalisé les NPo de 50 nm présentent le plus haut facteur d'augmentation de la sensibilité suite à une irradiation à 220 kVp : 1,43 comparé aux facteurs de 1,25 et 1,2 observés respectivement pour les tailles de 74 et 14 nm bien que la concentration extracellulaire en NPo soit identique. Deux aspects de l'étude sont à considérer, tout d'abord les quantités de NPo sont identiques dans le milieu extracellulaire, mais la quantité en atomes d'or est elle différente. Il en est de même pour les quantités d'or intracellulaires, en effet la quantité de NPo au sein de la cellule est différente et la quantité d'or par NPo est également différente. Il apparaît compliqué de comparer des conditions qui diffèrent par plusieurs paramètres même si, que ce soit pour la radiosensibilisation ou pour la photoactivation, il n'est pas encore évident que la sensibilité dépende linéairement de la quantité en atomes d'or ou bien de la quantité de nanoparticules quand l'atome lourd est sous forme de nanoparticule.

La dépendance de la radiosensibilité induite par les NPo de 50 nm à des rayonnements de différentes énergies est ensuite évaluée. Les SER obtenus sont de 1,17 ; 1,18 ; 1,43 et 1,66 pour les rayonnements d'énergies 6 MV, 660 keV, 220 kVp et 105 kVp. Il est intéressant de remarquer que, outre le SER obtenu pour les rayonnements de basses énergies, un SER de 1,2 est observé pour des hautes énergies. L'analyse des protéines H2AX et 53BP1 associées aux sites des DSB révèle une augmentation de ces dernières pour les cellules ayant internalisées les NPo comparées à celles simplement irradiées et ceci pour les irradiations à 220 kVp et 6 MV (dans des proportions différentes). Enfin, une analyse 24h après l'irradiation indique des cassures résiduelles qui suggèrent la mort cellulaire de ces cellules irradiées (Chithrani *et al.*, 2010).

La photoactivation des NPo sur l'ADN a également été mise en avant lors de plusieurs études sur des plasmides¹⁸. L'influence de différents paramètres tels que la taille et la concentration des NPo a été analysée lors des travaux de thèse d'Emilie Brun sur de l'ADN irradié en solution (Brun *et al.*, 2009). L'étude de la dégradation de la forme surenroulée en

¹⁸ ADN des bactéries, dont la forme principale est surenroulée.

présence de NPo suite à une irradiation à 49 keV permet de déterminer que l'effet de photoactivation des NPo augmente linéairement avec la taille de NPo (le rapport ADN : NPo étant identique). Une augmentation de la concentration en NPo permet également une augmentation linéaire de l'effet de sensibilisation de l'ADN au rayonnement.

Du point de vue de la photoactivation, la propriété première de ces NPo est leur concentration élevée en atomes lourds et c'est donc logiquement de cette observation que découle notre choix d'évaluer l'efficacité potentielle de la photoactivation de ces composés sur le modèle de gliome F98. Des études de survie cellulaire ont, tout d'abord, permis de déterminer les facteurs d'augmentation de dose obtenus sur le modèle F98, puis la toxicité et la cinétique de distribution des NPo ont été étudiées et enfin des études de survie sur des rats porteurs de gliomes ont été réalisées afin d'apprécier toute amélioration de la survie des animaux. La localisation des NPo intracellulaire dans les tissus a été caractérisée par microscopie électronique.

II. Photoactivation des NPo *in vitro*

Deux tailles de NPo ont été évaluées lors de ce travail, des NPo de 1,9 et 15 nm de diamètre. Le facteur d'augmentation de la sensibilité au rayonnement de basses énergies a été évalué pour ces NPo lors d'études de survie cellulaire. L'énergie optimale théorique pour obtenir le DEF le plus important a tout d'abord été déterminée pour l'or.

II.A. Energie optimale

L'énergie optimale du faisceau pour obtenir le DEF le plus important est déterminée de la même façon que pour l'iode en considérant un milieu homogène, contenant ou non de l'or. Sur la Figure 77, est représentée l'évolution des coefficients d'absorption massique pour un milieu contenant ou non 10 mg/ml en Au en fonction de l'énergie des photons.

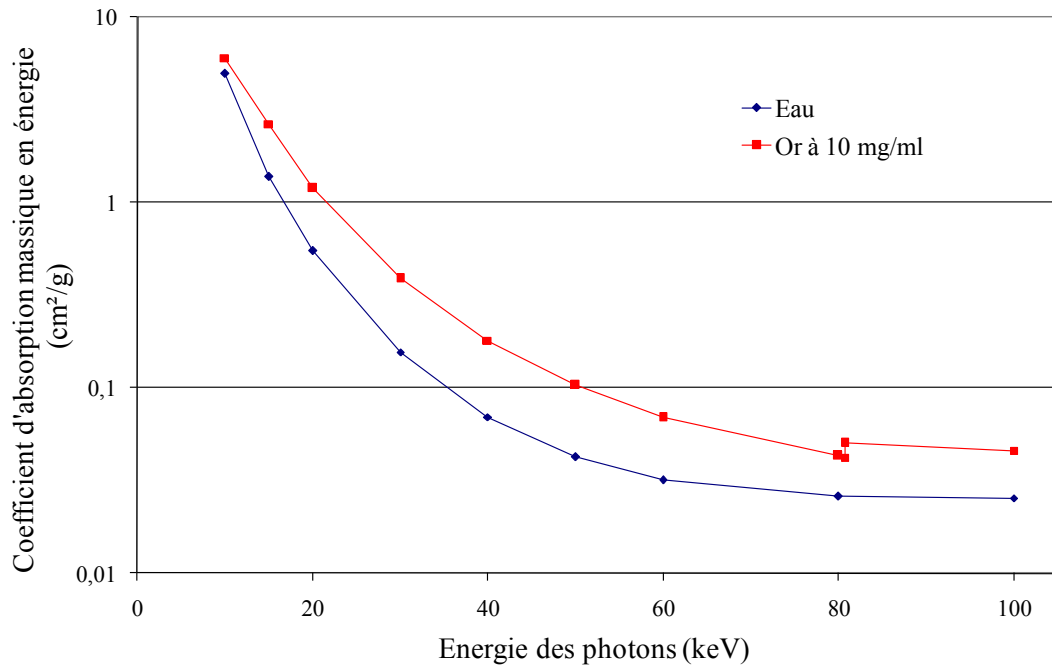


Figure 77 : Coefficients d'absorption massique en énergie de l'eau et d'un milieu aqueux contenant 10 mg/ml en Au (d'après le NIST) dans la gamme d'énergie utilisée pour la radiothérapie par rayonnement synchrotron.

Les DEF déduits du graphique ci-dessus sont représentés sur la Figure 78, ci dessous.

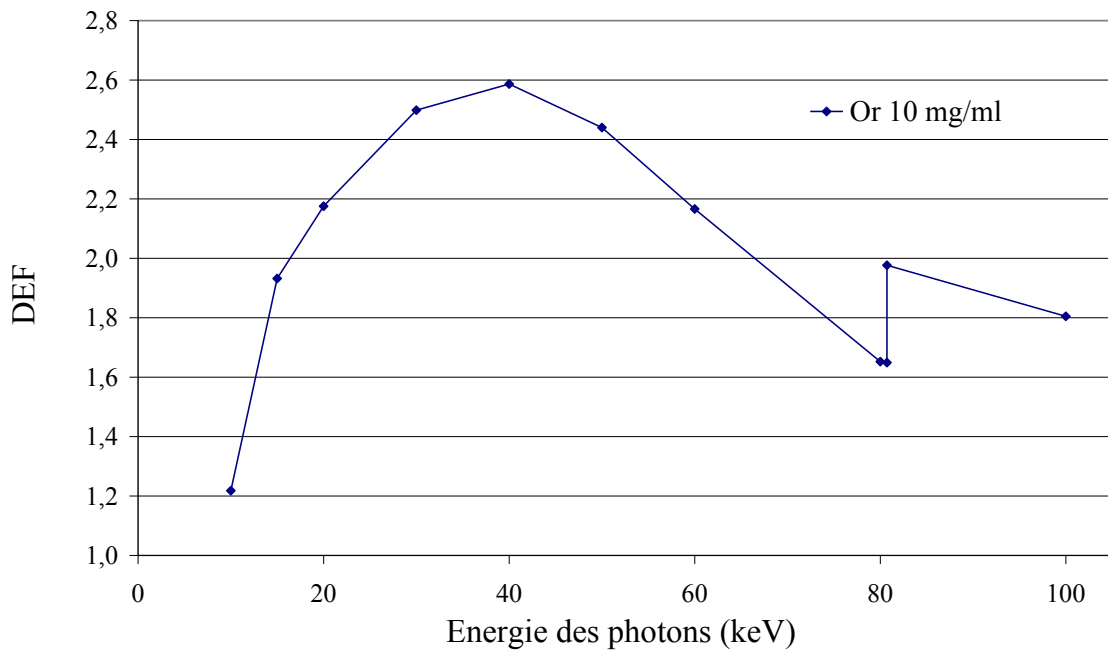


Figure 78 : Facteur d'augmentation de dose pour un milieu contenant 10 mg/ml d'or pour la gamme d'énergie disponible sur la ligne médicale.

L'énergie optimale se situe à 40 keV avec un DEF maximal de 2,6. On remarquera que l'optimum en énergie ne se situe pas au dessus du seuil K de l'or et n'est pas un pic étroit. La plage d'énergie optimale s'étend de 30 à 50 keV environ ($DEF \geq 2,4$). Dans cette étude, nous avons choisi d'irradier les cellules à 50 keV. Le seuil K de l'or est à 80,72 keV comme le montre le saut d'énergie à cette même énergie sur la Figure 78. L'étude d'Emilie Brun sur des plasmides a mis en avant un facteur de radiosensibilisation maximal atteint pour une énergie de 50 keV (Brun *et al.*, 2009). L'énergie choisie pour les études de photoactivation des NPo est donc de 50 keV.

II.B. NPo de 1,9 nm

Comme on l'a vu, toutes les études portant sur la localisation des NPo semblent s'accorder sur le fait que les NPo pénètrent dans la cellule. La capacité des NPo internalisées à induire une sensibilité des cellules aux rayonnements de basses énergies a tout d'abord été évaluée. Les courbes présentées ici sont la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les courbes contrôles sont normalisées par rapport au plating efficiency des cellules F98 et les courbes correspondantes aux résultats en présence d'or sont normalisées par rapport à la toxicité propre de l'agent.

II.B.1 Détermination du SER des NPo internalisées

Des cellules F98 sont exposées aux nanoparticules d'or de 1,9 nm (10 mg/ml en Au) pendant les 24h précédant l'irradiation. Puis les cellules sont rincées et irradiées en suspension dans des capillaires en PTFE¹⁹ de diamètre interne de 2 mm contenant du milieu de culture frais sans nanoparticules (Volume de la solution : 100 µl). Après irradiation les cellules sont dénombrées puisensemencées dans des boîtes de Pétri afin de réaliser un test de clonogénicité. Les résultats sont représentés sur la Figure 79.

¹⁹ PTFE : polytétrafluoroéthylène, polymère peu absorbant.

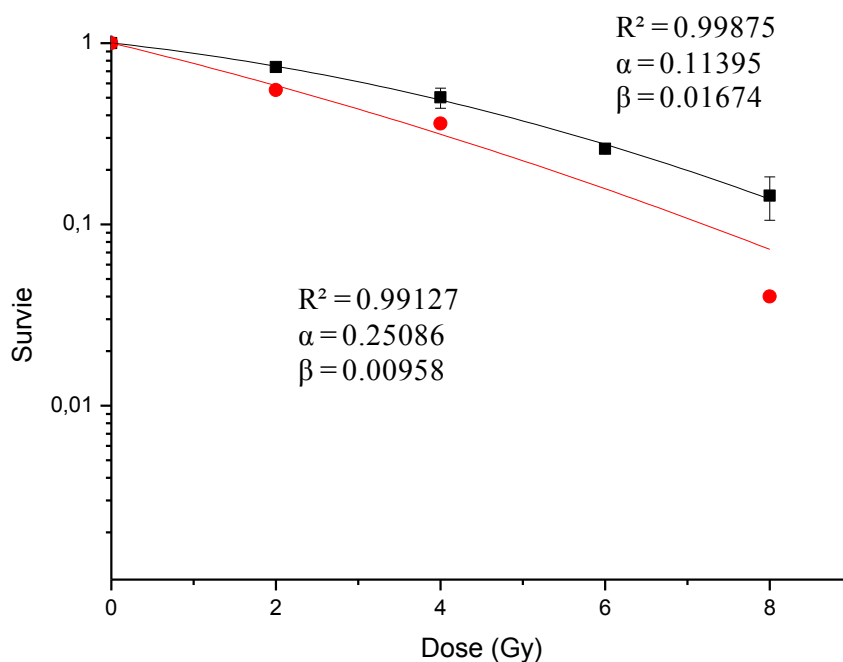


Figure 79 : Courbes de survie de cellules F98 pré-incubées 24h (rond rouge) ou non (carré noir) avec 10 mg/ml en Au de NPo de 1,9 nm et irradiées à 50 keV. Survie spécifique des cellules NPo : 0,80.

La courbe rouge correspond à la survie obtenue pour les cellules pré-incubées pendant 24h avec les NPo de 1,9 nm lors d'une seule expérience. La courbe est normalisée par rapport à la survie spécifique de NPo seules, qui est de 80% une fois rapporté à la survie spécifique des cellules F98. Le $SER_{10\%}$ déterminé à partir de ces données est égal à 1,22 ($Dose_{10\%}$ (contrôle) = 8,80 Gy et $Dose_{10\%}$ (NPo 1,9 nm) = 7,19 Gy), il semble donc que les NPo soient internalisées et sensibilisent les cellules au rayonnement de basse énergie. Toutefois cette courbe est le résultat d'une seule expérience et la répétition de ces expériences est nécessaire. De plus, la présence de NPo au sein des cellules en culture reste à confirmer par une technique de microscopie adaptée.

Lors de la SSRT, une partie des atomes lourds présents pendant l'irradiation des tissus sont souvent localisés dans l'espace interstitiel, une expérience a donc été réalisée pendant laquelle les cellules sont irradiées dans un milieu contenant des NPo à une concentration de 10 mg/ml.

II.B.2 Détermination du SER pour des cellules irradiées en solution dans des NPo

L'augmentation de la sensibilité des cellules au rayonnement en présence d'or dans le milieu est évaluée à 50 keV. Les cellules sont décollées des flasques de culture puis elles sont reprises dans 100 μ l de milieu de culture contenant 10 mg/ml en Au de NPo de 1,9 nm et irradiées dans les mêmes capillaires que précédemment. Les résultats sont représentés sur la Figure 80.

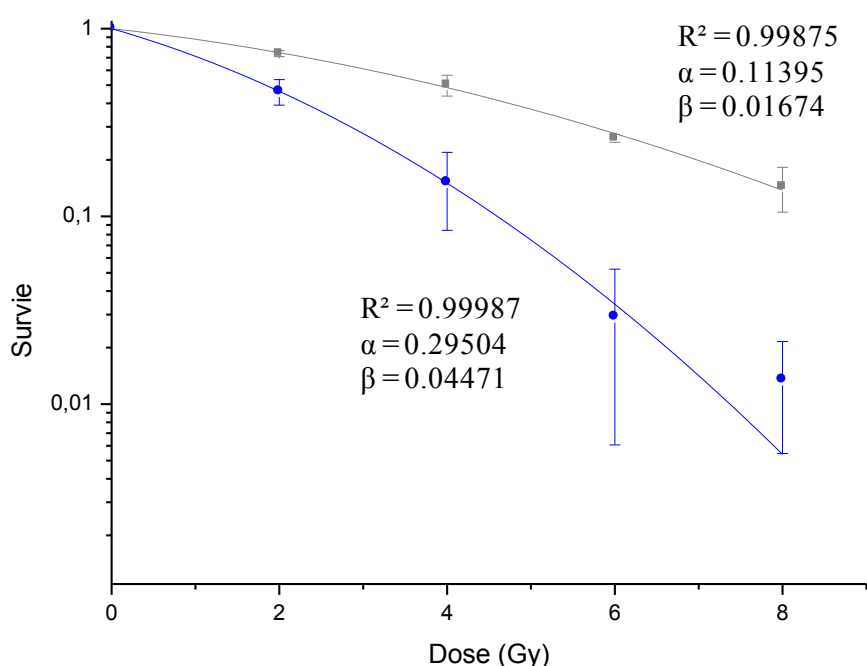


Figure 80 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV (rond bleu) en présence ou non (carré gris) de NPo de 1,9 nm (10 mg/ml en Au). Survie spécifique des cellules NPo : 1.

Aucune toxicité n'est engendrée par la présence des NPo dans le milieu de culture des cellules pendant le temps que dure l'irradiation (15 min au maximum). Les cellules sont sensibilisées à l'irradiation par la présence des NPo de 1,9 nm. Le DEF obtenu est égal à 1,92 à 50 keV (Dose_{10%} (contrôle) = 8,80 Gy et Dose_{10%} (NPo 1,9 nm) = 4,59 Gy).

Afin d'observer une éventuelle variation des résultats de photoactivation selon la taille de NPo, des expériences semblables ont été menées avec des NPo de 15 nm de diamètre.

II.C. NPo de 15 nm

II.C.1 Détermination du SER des NPo internalisées

Une étude préliminaire a permis de mettre en avant une toxicité conséquente des NPo de 15 nm pour les cellules considérées. Après 24h d'incubation, le taux de survie n'est, en effet, que d'environ 30 à 40% alors que celui observé pour les NPo de 1,9 nm est de 80%. Un temps d'exposition de 3h40, conduisant à une toxicité similaire à celle obtenue pour les NPo de 1,9 nm a donc été déterminé. Les conditions d'irradiation et de préparation des cellules sont identiques à celles décrites ci-dessus et les résultats sont présentés sur la Figure 81.

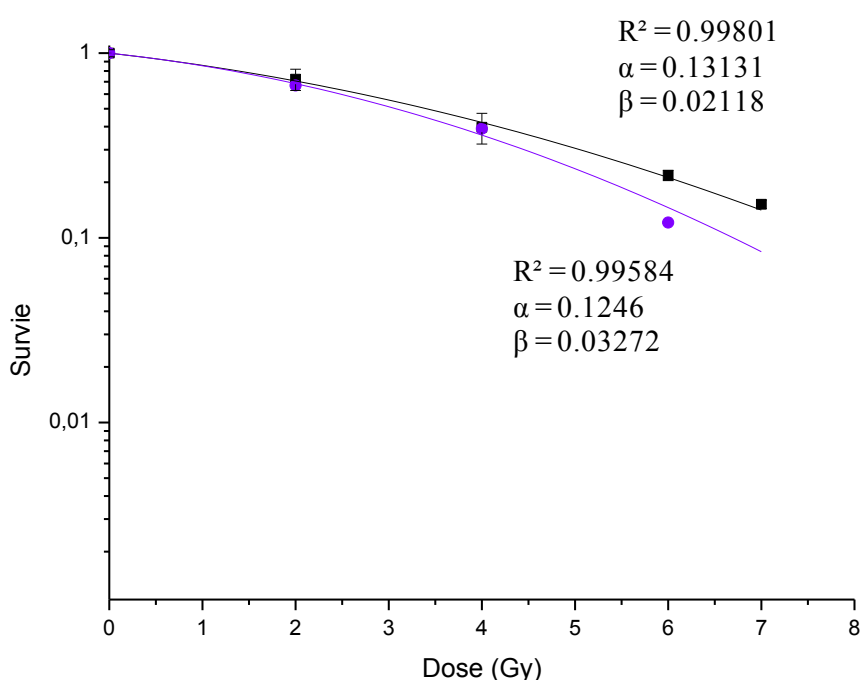
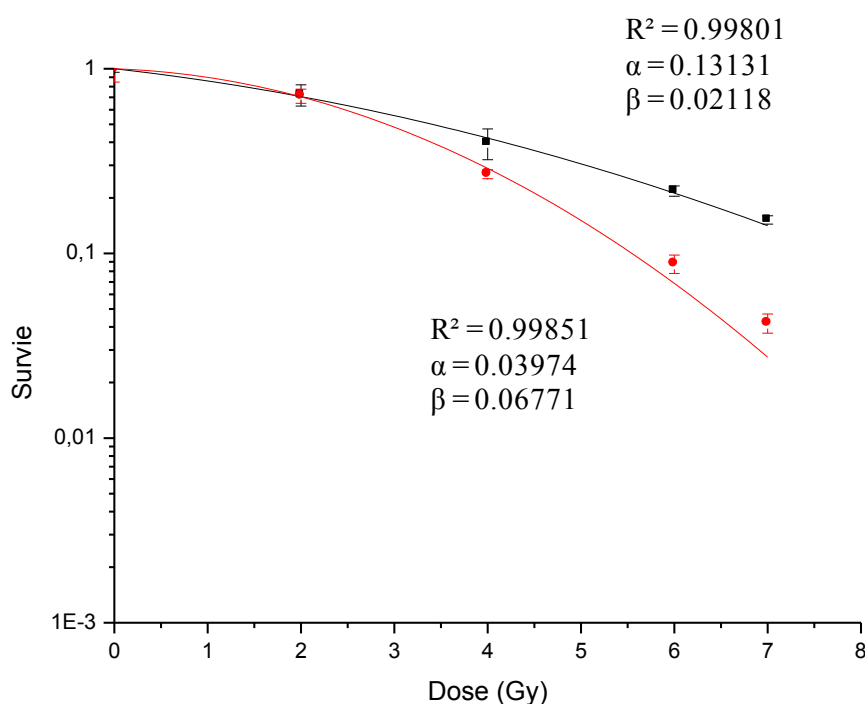


Figure 81 : Courbes de survie de cellules F98 pré-incubées 3h40 (rond violet) ou non (carré noir) avec 10 mg/ml en Au de NPo 15 nm et irradiées à 50 keV. Survie spécifique des cellules NPo : 0,80.

La courbe de résultats correspond ici à une seule expérience. Le DEF obtenu est de 1,16 (Dose_{10%} (contrôle) = 7,77 Gy et Dose_{10%} (NPo 15 nm) = 6,69 Gy), mais il est difficile de conclure et des expériences complémentaires sont nécessaires.

II.C.2 Détermination du SER pour des cellules irradiées en solution dans des NPo

Une étude avec des cellules irradiées dans du milieu de culture contenant 10 mg/ml en Au de NPo de 15 nm a été réalisée et les résultats figurent ci-dessous. L'efficacité de ces NPo à sensibiliser les cellules au rayonnement a été étudiée pour une énergie de 50 keV.



**Figure 82 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV en présence (rond rouge) ou non (carré noir) de nanoparticules d'or de 15 nm pendant l'irradiation (10 mg/ml en Au).
Survie spécifique des cellules NPo : 0,96.**

La présence des NPo de 15 nm dans le milieu au moment de l'irradiation entraîne une sensibilité des cellules au rayonnement de 50 keV. La dose nécessaire pour obtenir 10% de survie pour les cellules contrôle est de 7,77 Gy et celle des cellules NPo est de 5,54 Gy, le DEF est donc égale à 1,40. Ces résultats confirment que les NPo de 15 nm peuvent également sensibiliser les cellules F98 à une irradiation monochromatique de 50 keV, mais de façon moins importante que les NPo de 1,9 nm à concentration en or égale dans le milieu de culture.

Les NPo de 15 nm semblent donc également pénétrer dans les cellules F98, mais étant plus toxique que les NPo de 1,9 nm sur nos cellules F98, les temps d'exposition ont du être réduits ce qui a probablement limiter le taux d'incorporation des NPo et par conséquent la

radiosensibilisation. Leur présence tout comme celle des NPo de 1,9 nm permet tout de même une augmentation de la radiotoxicité suite à une irradiation monochromatique de 50 keV.

Des essais ont également été réalisés avec un générateur de rayons X de tension de polarisation de 200 kVp et un débit de dose similaire à celui disponible au synchrotron de 1 Gy/min. Cette expérience diffère simplement de celle présentée ci-dessus par la nature polychromatique du faisceau de rayons X. Les résultats sont représentés sur la Figure 83.

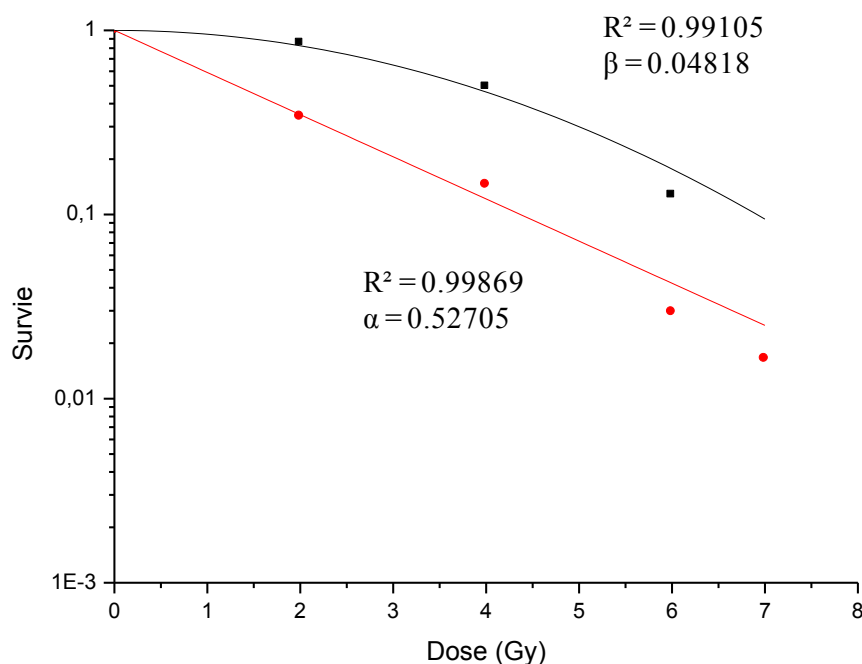


Figure 83 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 200 kVp en présence (rond rouge) ou non (carré noir) de nanoparticules d'or de 15 nm (10 mg/ml en Au). Survie spécifique des cellules NPo : 0,81.

Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, mais il apparaît clairement que les NPo de 15 nm sensibilisent également les cellules à un tel rayonnement. L'énergie effective²⁰ correspondante à une tension de polarisation de 200 kVp et une filtration de 2 mm d'aluminium est d'environ 70 keV. Le DEF observé est de 1,58 (Dose_{10%} (contrôle) = 6,91 Gy et Dose_{10%} (NPo 1,9 nm) = 4,37 Gy). Ce résultat est comparable à celui obtenu avec un faisceau monochromatique de 50 keV.

²⁰ L'énergie effective d'un spectre de rayons X correspond à l'énergie pour laquelle la moitié des photons auraient parcouru la même distance dans le milieu que ceux d'un faisceau monochromatique d'une telle énergie.

II.D. Comparaison des NPo de 1,9 nm et 15 nm

Le récapitulatif des résultats obtenus à 50 keV pour des cellules irradiées en présence de 10 mg/ml en or de NPo de 1,9 ou 15 nm est représenté sur la Figure 84.

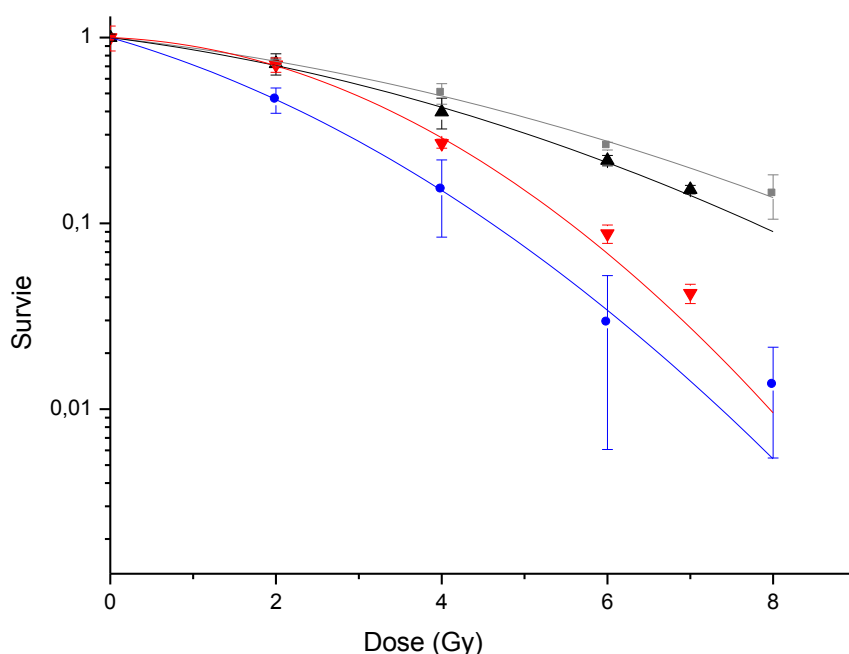


Figure 84 : Courbes de survie de cellules F98 irradiées à 50 keV en présence ou non (noir et gris) de 10 mg/ml en Au de NPo de 1,9 nm (bleu) ou de 15 nm (rouge).

A quantité d'or identique, les NPo de 1,9 nm sont légèrement plus efficaces que les NPo de 15 nm. Il peut être proposé que la plus grande quantité de NPo de 1,9 nm soit responsable de l'augmentation de ce DEF par rapport à celui des NPo de 15 nm. En effet, pour une même quantité d'or le nombre de NPo de 1,9 nm est plus important et peut notamment créer des dommages en plus grands nombres de lieux que les NPo de 15 nm. Il serait intéressant de compléter ces résultats en réalisant des expériences avec le même nombre de NPo.

II.E. Conclusion et discussion

La toxicité des NPo de 1,9 nm sur les cellules F98 après 24h d'incubation n'est pas très élevée tandis que pour un temps d'incubation identique, les NPo de 15 nm présentent une toxicité beaucoup plus importante avec un taux de survie de l'ordre de 30 à 40%, révélant une

toxicité considérablement plus élevée des NPo de plus grande taille. La toxicité des NPo de façon générale est assez controversée et paraît dépendre aussi bien de la taille et de la forme des nanoparticules que des molécules présentes en surface, alors que le type cellulaire étudié serait moins influant pour les NPo de petites tailles. Comme beaucoup de composés les NPo sont toxiques à concentration très élevée, et il était donc important de déterminer leur cytotoxicité pour les concentrations utilisées. En effet dans le cas de la photoactivation une concentration élevée en atome lourd est nécessaire afin d'obtenir un facteur d'augmentation de dose conséquent. Selon les études *in vitro* précédentes, les NPo recouvertes de ligands phosphine de 1 à 2 nm seraient toxiques (IC_{50}^{21} : 46 μ M) tandis que celles de plus de 15 nm n'indui raient pas de toxicité (Pan *et al.*, 2007). Les 2 voies de mort cellulaire : apoptose et nécrose sont observées dans la cytotoxicité de ces NPo avec 80% des cellules exposées aux NPo de 1,4 nm en nécrose. Si une toxicité des NPo de très petites tailles : 1 à 2 nm est rapportée, les NPo de 10, 30 et 60 nm de diamètre sont considérées comme un système de référence contre lequel comparer les autres types de nano-objets (Jahnen-Dechent and Simon, 2008).

En comparaison avec les résultats obtenus avec l'iode et pour une concentration identique d'atomes lourds le DEF obtenu pour l'ioméron (1,46) et les DEF obtenus pour les NPo sont de 1,40 et 1,92 pour les NPo de 15 nm et 1,9 nm respectivement. Les NPo de 1,9 nm semblent donc être d'une plus grande efficacité que l'ioméron du moins pour les études *in vitro*, ce qui est encourageant pour les essais de thérapie. En effet, les NPo de 1,9 et 15 nm sensibilisent les cellules F98 au rayonnement monochromatique de basse énergie, et semblent donc être des composés prometteurs pour la SSRT.

III. Photoactivation des NPo *in vivo*

Afin d'évaluer l'efficacité d'une association de NPo et d'un rayonnement de basse énergie en thérapie des gliomes, des essais précliniques sur des rats porteurs de gliomes ont été réalisés. Le franchissement de la BHE étant un obstacle important, les NPo ont été injectées par voie intracérébrale par CED. Après un rappel des connaissances actuelles sur la distribution et la toxicité des NPo *in vivo*, la toxicité d'une injection intracérébrale de NPo a

²¹ IC_{50} : concentration d'inhibition de 50% de l'effet maximum. (ici concentration nécessaire pour observer 50% de mortalité).

été déterminée par l'injection de solution de différents volumes et concentrations en NPo sur des rats sains.

III.A. Connaissances actuelles de la biodistribution

Les différentes études sur la biodistribution des NPo permettent de conclure que les NPo sont capables de circuler dans la circulation sanguine et d'être distribuées dans tout le corps. La distribution dans les tissus se révèle être dépendante de la taille des nanoparticules et de leurs voies d'injection. Les plus petites NPo favorisent une distribution très étendue, comme le rapportent les travaux de Semmler-Behnke. En effet, 24h après une injection intraveineuse de NPo chez le rat, les NPo de 18 nm sont complètement éliminées du sang et observées majoritairement dans le foie (94% des NPo) alors que les NPo de 1,4 nm sont retrouvées dans le foie (47%), les reins (5%), les urines, les fèces, la peau et le sang (4%). La quantité élevée de NPo observée dans le reste du corps (en dehors des organes) reflète une distribution homogène des NPo de 1,4 nm à travers tout le corps. La haute concentration de ces NPo dans les tissus gras sous-cutanés (19%) est notamment surprenante et n'a pas pu être expliquée (Semmler-Behnke *et al.*, 2008). De façon générale, le foie paraît être le site privilégié d'accumulation des NPo de tailles de 10 à 250 nm alors que les NPo plus petites (1 à 15 nm) sont dispersées dans tout le corps (De Jong *et al.*, 2008). Il a été proposé que les NPo soient captées par les macrophages résidants du foie qui éliminent les nanoparticules vers la circulation (Johnston *et al.*, 2010). Sonavane souligne dans ses travaux que les NPo de 15 et 50 nm sont détectées dans le cerveau de souris 24h après l'injection de NPo par voie intraveineuse. La quantité de NPo de 15 nm dans le cerveau est de 10 µg Au/g de tissu ce qui n'est pas négligeable en comparaison à la quantité détectée dans le foie de 52 µg Au/g de tissu (Sonavane *et al.*, 2008). Ceci indique que les NPo selon leurs tailles traversent la BHE. Plusieurs hypothèses sont envisagées quant à la perméabilité de la BHE aux NPo. Tout d'abord, les pieds astrocytaires et les cellules endothéliales qui forment la BHE ne sont séparés que d'une distance de 20 nm, ce qui est assez large pour laisser circuler les plus petites NPo. Une autre voie, mise en avant par Petri avec l'utilisation de la doxorubicine en traitement des glioblastomes, décrit l'interaction de protéines absorbées à la surface des nanoparticules, avec des récepteurs induisant l'endocytose par les cellules endothéliales (Petri *et al.*, 2007).

Toutes ces réflexions font suite à une injection systémique et sont à voir sous un autre angle quant il s'agit de considérer le choix des NPo pour une injection intracérébrale.

III.B. Toxicité des NPo *in vivo*

A notre connaissance, aucune donnée n'est encore publiée à ce jour concernant la toxicité des NPo suite à une injection intracérébrale. La toxicité d'une injection intracérébrale des NPo de 1,9 et 15 nm a donc été évaluée sur des rats sains.

III.B.1 Evaluation de la toxicité des NPo de 1,9 nm

Un volume de 5 μ l de NPo de 1,9 nm à différentes concentrations est injecté par voie intracérébrale en CED à des rats sains. Les conditions expérimentales sont récapitulées dans le Tableau 12.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Volume	Concentration	Profondeur
NPo 1,9 nm	Hamilton gastight 25 μ l 1702, 32 G	0,5 μ l/min	5 μ l	de 0 à 50 mg/ml en Au	6 mm puis 5,5 mm

Tableau 12 : Paramètres d'injection des NPo de 1,9 nm.

5 groupes de 3 rats chacun sont constitués. Afin de déterminer la toxicité du mode d'injection, 5 μ l de PBS, qui est le solvant dans lequel les NPo sont mises en suspension, sont injectés au premier groupe. Les autres groupes reçoivent respectivement 5 μ l d'une solution à 5, 10, 20 et 50 mg/ml en Au de NPo. Chaque jour, les rats sont pesés et leurs comportements observés pendant un mois. Les résultats sont représentés sur la Figure 85.

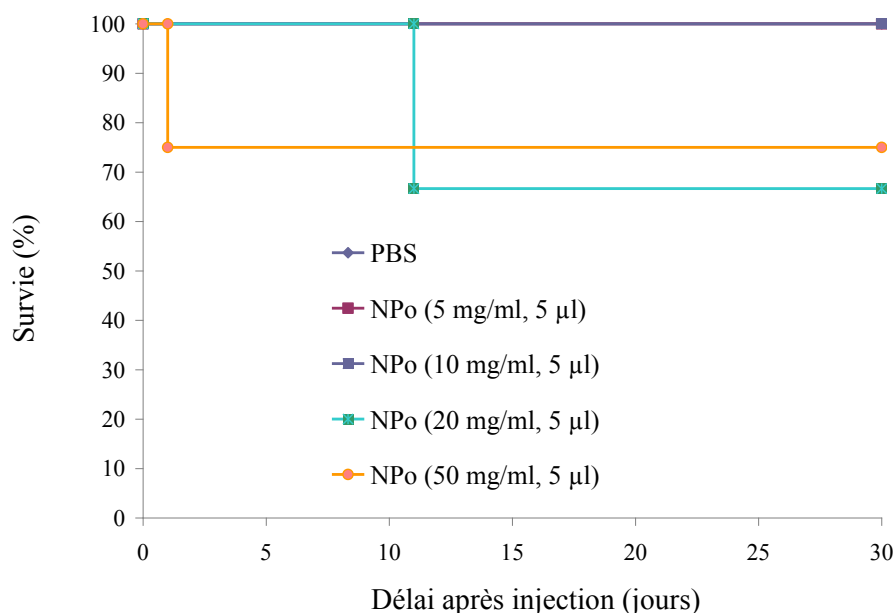


Figure 85 : Courbes de Kaplan-Meier des rats sains après une injection intracérébrale de 5 µl de PBS ou de NPo de 1,9 nm. Les temps de survie sont indiqués en jours après l'injection des solutions (J0).

Aucune toxicité n'est observée pour les rats ayant reçu le PBS ou les concentrations de 5 et 10 mg/ml en Au de NPo. Un rat sur 3 du groupe ayant reçu 20 mg/ml est mort 11 jours après l'injection des NPo tandis que les deux autres ne présentent aucun signe de toxicité. Enfin, l'injection de 50 mg/ml a entraîné la mort d'un des 4 rats le lendemain de l'injection, les autres rats ne montrent aucun signe de toxicité. Les rats sont euthanasiés un mois après l'injection de l'or, et le cerveau, les reins, le foie et le cœur sont prélevés et conservés dans du formol afin d'être analysés soit par histologie soit par ICP-MS pour déterminer la quantité d'or dans les tissus. Ces analyses n'ont pas encore été réalisées.

III.B.2 Evaluation de la toxicité des NPo de 15 nm

Une étude similaire a été réalisée pour évaluer la toxicité propre au NPo de 15 nm suite à une injection intracérébrale. Les conditions expérimentales sont identiques à celles présentées ci-dessus. 4 groupes de 2 rats reçoivent 5, 10, 25 et 50 mg/ml d'Au de NPo. Les résultats figurent ci-dessous.

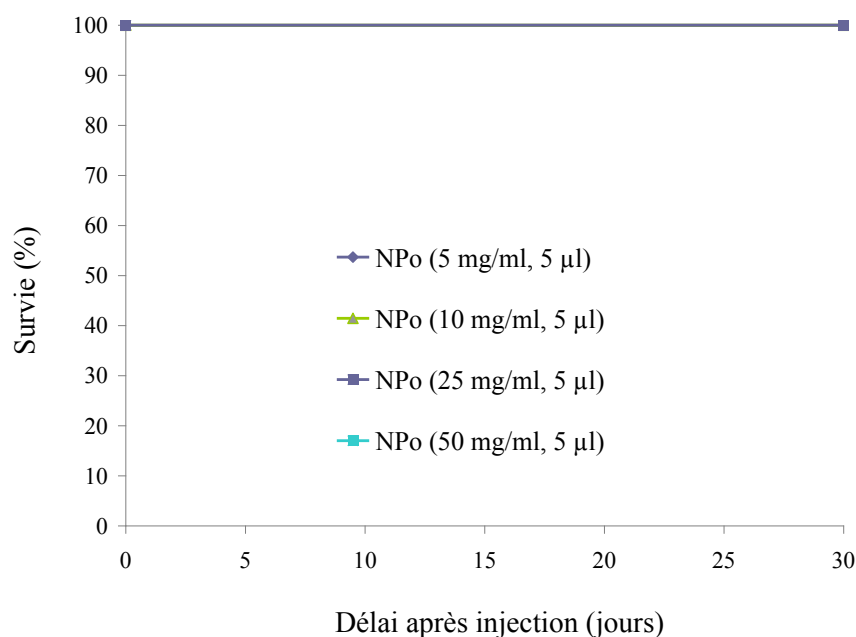


Figure 86 : Courbes de Kaplan-Meier des rats sains après une injection intracérébrale de 5 µl de NPo de 15 nm. Les temps de survie sont indiqués en jours après l'injection des solutions (J0).

Pour les 3 concentrations les plus faibles aucune toxicité n'est observée chez les rats. Une perte de poids plus longue que celle attribuée à l'anesthésie est observée chez un des 2 rats ayant reçu 50 mg/ml. Un mois après l'injection d'or, les rats sont euthanasiés et les cerveaux prélevés et congelés à -80°C .

La toxicité des NPo après une injection intracérébrale semble légèrement supérieure pour les NPo de 1,9 nm, mais le peu d'effectif dans les groupes ne permet pas de l'affirmer.

III.C. Imagerie par tomographie X

Les NPo étant majoritairement composées d'atomes lourds, et au vue des concentrations utilisées, l'imagerie par tomographie X va nous permettre de visualiser et quantifier la concentration en or dans le cerveau des rats.

L'évolution de la concentration en or suite à l'injection intracérébrale en CED de solutions de NPo a été étudiée par tomographie X.

III.C.1 Principe de la tomographie par rayons X

La tomographie, technique d'imagerie non destructive, consiste à réaliser des images par coupes successives puis à reconstituer l'image d'origine en 3 dimensions. Pour ceci des

rayons X de basses énergies traversent le sujet ou l'échantillon imagé. Le détecteur situé derrière l'échantillon permet d'obtenir des profils d'atténuation selon un grand nombre d'incidences. Dans le cas du synchrotron, la source étant fixe, c'est l'échantillon qui tourne sur lui même. Les données sont enregistrées sous forme d'une matrice appelée sinogramme (Figure 87), pour lequel une ligne correspond à un profil d'atténuation selon une des incidences. Les profils d'atténuation sont obtenus suite à l'hétérogénéité de l'atténuation du faisceau selon la nature du milieu traversé.



Figure 87 : L'ensemble des profils d'atténuation forme un sinogramme.

A partir du sinogramme, un algorithme de reconstruction permet d'obtenir une image qui correspond à la carte des coefficients d'atténuation linéique de la coupe considérée (μ en cm^{-1}). L'utilisation d'un faisceau monochromatique permet de s'affranchir en grande partie des biais liés à la nature des sources conventionnelles (polychromaticité, durcissement, divergence du faisceau, taille de la source), on obtient ainsi la valeur absolue du coefficient d'atténuation.

Les coefficients d'atténuation en fonction de l'énergie des photons, sont représentés sur la Figure 88 pour de l'eau et pour un milieu aqueux contenant 10 mg/ml d'or ou d'iode.

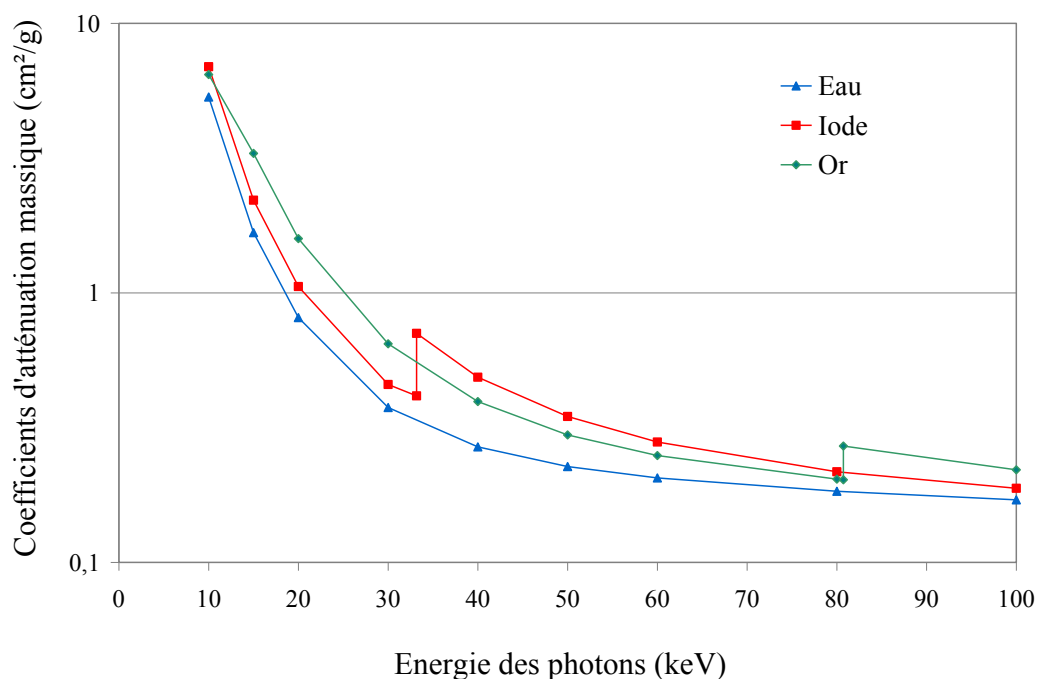


Figure 88 : Coefficients d'atténuation massique de l'eau et d'un milieu aqueux contenant 10 mg/ml en atomes lourds en fonction de l'énergie des photons (d'après le NIST).

Le rapport le plus important entre les coefficients d'atténuation de l'eau et d'un milieu contenant 1% d'or est observé pour une énergie d'environ 20 keV. Ce rapport atteint une valeur de 2. Le même maximum est observé pour l'iode à 35 keV. Cependant, l'énergie optimale pour obtenir un bon contraste dans l'image dépend non seulement de l'atténuation relative entre l'élément lourd et l'eau mais aussi de la dimension de l'échantillon traversé. En effet aux basses énergies, un objet très volumineux absorbera de façon trop importante le rayonnement et on ne pourra pas réaliser une image de qualité satisfaisante à une dose X raisonnable. La tête du rat étant de petite taille une énergie de 35 keV est un bon compromis pour la quantification par tomographie X de composés lourds (or et iode) dans le cerveau.

L'évolution de la distribution des NPo sur le site de la zone tumorale par tomographie X quantitative à 35 keV a été étudiée.

III.C.2 Evolution temporelle de la distribution des NPo de 1,9 nm

Pour ceci, 14 jours après l'implantation des tumeurs selon les conditions récapitulées dans le Tableau 13, 20 µl de NPo de 1,9 nm à 100 mg/ml d'or ont été injectés à 2 rats.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 µl 701 N, aiguille 26 sG	0,5 µl/min	non	4 µl	1000 cellules	7 mm puis 6,5 mm
NPo 1,9 nm	Hamilton gastight 25 µl 1702 RN, 32 G	0,5 µl/min	-	20 µl	100 mg/ml en Au	7 mm puis 6,5 mm

Tableau 13 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 1,9 nm.

Le descriptif des techniques d'implantation des tumeurs, de l'injection des solutions, de l'imagerie et de l'irradiation sont décrites dans le chapitre Techniques expérimentales et les conditions précises sont rapportées dans le chapitre Matériels et méthodes.

Des images cérébrales tomographiques sont acquises à 35 keV, toutes les 10 min pendant environ 2h. Un exemple d'image obtenu avec des NPo de 15 nm est présenté sur la Figure 89.

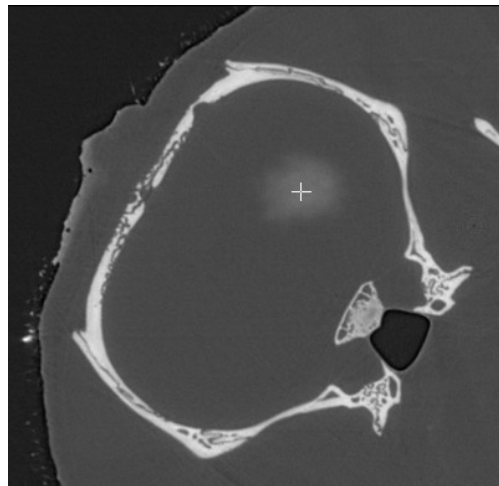


Figure 89 : Image tomographique suite à une injection intracérébrale de 5 µl de NPo de 15 nm. La zone claire correspond à une prise de contraste plus importante des tissus contenant les NPo.

La différence des coefficients d'atténuation linéique entre un voxel du tissu cérébral et un voxel de la zone contenant l'or (Figure 89) permet de calculer des concentrations en or selon l'Équation 1.

$$C_{or} = \frac{\mu_{mélange} - \mu_{tissu}}{\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{35keV, Au}}$$

Équation 1

Avec C_{or} , la concentration en or (g/cm^3), $\mu_{\text{mélange}}$ et μ_{tissu} les coefficients linéiques d'atténuation (cm^{-1}), dont les valeurs sont directement mesurables dans l'image tomographique, et $(\mu/\rho)_{35 \text{ keV, Au}}$, le coefficient d'atténuation massique de l'or à 35 keV ($(\mu/\rho)_{35 \text{ keV, Au}} = 18,11 \text{ cm}^2/\text{g}$). Les résultats obtenus pour les 2 rats imités suite à l'injection intracérébrale de 20 μl d'une solution à 100 mg/ml en or, sont représentés sur la Figure 90.

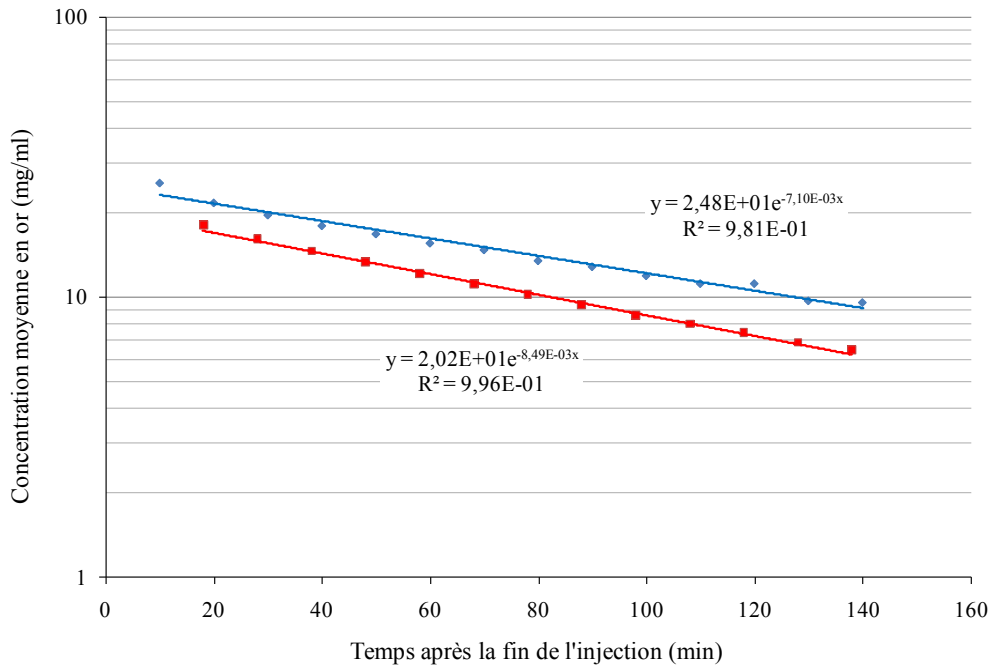


Figure 90 : Evolution temporelle de la concentration moyenne en or après l'injection de NPo de 1,9 nm.

Les concentrations moyennes en or dans un volume défini par un seuil fixé à 5% de la concentration nominale sont représentées en fonction du temps après l'injection sur cette figure. La taille des voxels est de 45 μm de coté et la concentration mesurée est donc une concentration macroscopique. Une dilution par 4 du volume injecté est observée et correspond au fait que la concentration calculée pour un voxel est en fait une moyenne de la concentration en or dans l'espace interstitiel et dans l'espace intracellulaire. Or le milieu interstitiel représente environ 20 % du volume dans les tissus cérébraux. L'évolution temporelle de la concentration en or peut être ajustée à une fonction exponentielle dont l'équation est $c = c_0 e^{-t/\tau}$ avec c_0 la concentration en or à t_0 , t le temps en minutes et τ la constante de temps. La constante de temps τ correspond au temps pour lequel 37% de la concentration initiale est obtenue. Ce facteur vaut : 140,8 min pour le premier rat et 119,0 min pour le second rat. D'autre part, même si les concentrations initiales en or diffèrent,

l'évolution des concentrations est identique pour les 2 rats. La différence des concentrations en or obtenue pour les 2 animaux peut être expliquée par des phénomènes de reflux de la solution d'or le long du trajet de l'aiguille lors de l'injection intratumorale d'or ou par l'hétérogénéité des tissus tumoraux.

Une étude *in vivo* menée par Hainfeld a conduit à des conclusions similaires pour des tumeurs sous-cutanées. Suite à l'injection par la veine de la queue d'une solution de NPo de 1,9 nm (à 270 mg/ml en Au) chez des souris porteuses de tumeur, des images réalisées à différents temps ont permis d'observer que 24h après l'injection, la zone tumorale contient encore de l'or (Hainfeld *et al.*, 2006).

III.C.3 Evolution temporelle de la distribution des NPo de 15 nm

Une expérience similaire a été réalisée pour les NPo de 15 nm. Le volume et la concentration de NPo sont toutefois différents et sont résumés dans le Tableau 14.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 µl 1701 SN, 32 G	14,36 µl/min	oui	4 µl	4000	6 mm puis 5,5 mm
NPo 15 nm	Hamilton gastight 25 µl 1702 RN, 32 G	0,5 µl/min	-	5 µl	25 mg/ml en Au	6 mm puis 5,5 mm

Tableau 14 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 15 nm.

Suite à l'injection intracérébrale de 5 µl de NPo à 25 mg/ml d'or, à 5,5 mm de profondeur dans le noyau caudé chez des rats porteurs de tumeurs, des images tomographiques réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, ont été acquises afin d'observer la cinétique de distribution des NPo. Les résultats sont représentés sur la Figure 91.

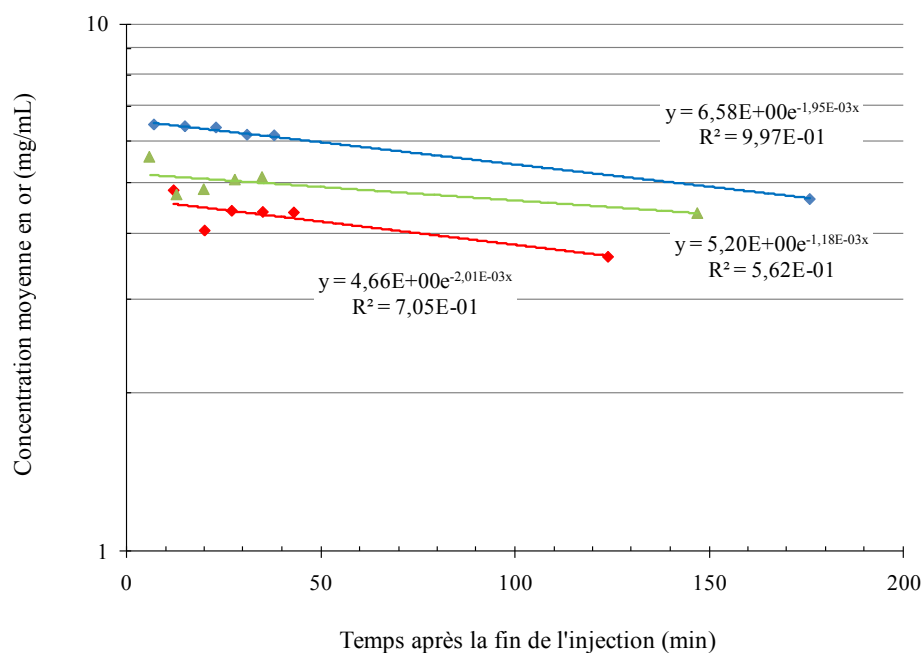


Figure 91 : Evolution de la concentration moyenne en or en fonction du temps après l'injection des NPo de 15 nm. Les différentes courbes correspondent à des expérimentations sur différents rats.

Les constantes de temps définies suite à l'ajustement des données par une exponentielle sont égales à 512,8 min, 847,4 min et 497,5 min pour les rats dont les données sont respectivement représentées en bleu, vert et rouge. Ces constantes de temps sont considérablement plus élevées que celles observées suite à l'injection de NPo de 1,9 nm.

Le traitement de ces données grâce au logiciel Avizo® a été réalisé par Sébastien Besse et a permis d'obtenir une représentation en 3 dimensions des volumes de distribution en or. Pour exemple, le volume de distribution en or à 7 min (pour le rat représenté en bleu sur la Figure 91) est représenté sous différents angles sur la Figure 92.

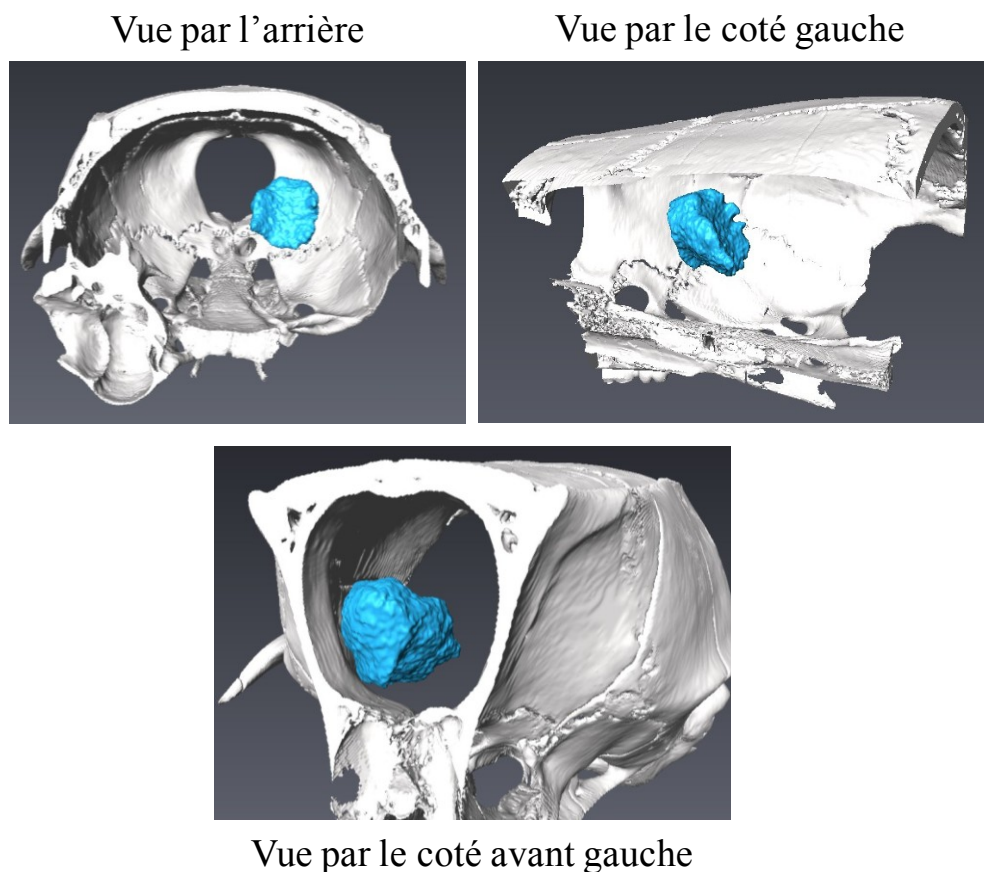


Figure 92 : Volume de distribution de l'or défini à un seuil de 5% de la concentration nominale et obtenu 7 min après l'injection de NPo de 15 nm.

On peut noter que la distribution n'est pas sphérique et qu'elle semble soumise à des contraintes.

Les NPo de 15 nm paraissent donc être plus retenues par les tissus que celles de 1,9 nm. Dans cette étude la concentration macroscopique moyenne est considérée, et celle des NPo de 1,9 nm diminue plus rapidement que la concentration de celle de 15 nm, ce qui laisse supposer que les NPo de 1,9 nm diffusent plus loin dans les tissus ou sont évacuées plus rapidement par la circulation sanguine. La taille plus importante des NPo de 15 nm rend certainement plus fastidieuse la circulation des NPo au sein des tissus.

Cette observation correspond au phénomène d'“enhanced permeability and retention” (effet EPR), décrit dans la littérature (Iyer *et al.*, 2006) et illustré sur la Figure 93.

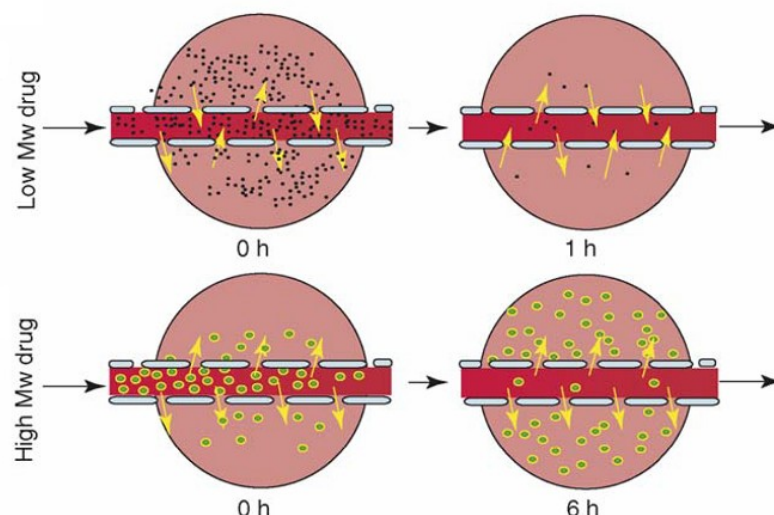


Figure 93 : Diffusion des composés de faible ou haut poids moléculaires de la circulation vers le milieu interstitiel des tissus tumoraux (Iyer *et al.*, 2006).

Les composés de faible poids moléculaire diffusent librement des vaisseaux sanguins vers les tissus et inversement grâce à leurs petites tailles, la concentration dans la tumeur diminue considérablement 1h après l'injection, lorsque la concentration dans les vaisseaux diminue. A l'inverse, les composés de plus haut poids moléculaires repassent difficilement dans la circulation sanguine engendrant une accumulation de ces composés dans les tissus tumoraux. Ces observations concernent une injection systémique des agents, mais le même phénomène peut être à l'origine des différences de cinétique observées lors de notre étude. Ainsi les composés de 15 nm, de par leurs tailles plus importantes, résideraient plus longtemps dans les tissus tumoraux que les NPo de 1,9 nm, qui seraient évacuées de façon plus rapide par la circulation. Comme on a pu le voir, la littérature rapporte de façon générale que lors d'injections systémiques de NPo, celles de plus petits diamètres sont observées en concentrations considérables dans plusieurs organes tandis que celle de 15 nm sont évacuées majoritairement par le foie.

III.C.4 Comparaison NPo / ioméron

L'étude de Julia Rousseau sur des rats porteurs de tumeurs F98 a permis de déterminer que la constante de temps de la distribution d'iode suite à l'injection intracérébrale d'ioméron dans des conditions similaires à celles présentées ici, n'est que d'environ 50 min (Rousseau *et al.*, 2007b). Ces données confirment que le poids moléculaire des composés injectés influence grandement leurs cinétiques de distribution.

Une étude portant sur l'influence de différents composés sur la distribution de l'ioméron ou de NPo de 15 nm a été effectuée. Seule une partie des résultats est présentée ici.

L'évolution de la distribution de NPo de 15 nm et d'ioméron ont été étudiées suite à l'injection de ces composés à un rat porteur de tumeur et préalablement euthanasié. Ainsi le système circulatoire du rat est arrêté et seuls les phénomènes de diffusion à travers les milieux sont considérés.

Les conditions expérimentales sont récapitulées dans le Tableau 15.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ l 1701 SN, 32 G	14,36 μ l/min	oui	4 μ l	4000	6 mm puis 5,5 mm
Ioméron	Hamilton gastight 25 μ l 1702 RN, 32 G	0,5 μ l/min	-	5 μ l	100 mg/ml en I	6 mm puis 5,5 mm
NPo 15 nm					25 mg/ml en Au	

Tableau 15 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des solutions d'atomes lourds.

5 μ l d'une solution de 100 mg/ml en iode ou de 25 mg/ml en or sont injectés par voie intracérébrale à des rats porteurs de tumeurs. L'évolution de la concentration moyenne pour les 2 composés est représentée sur la Figure 94.

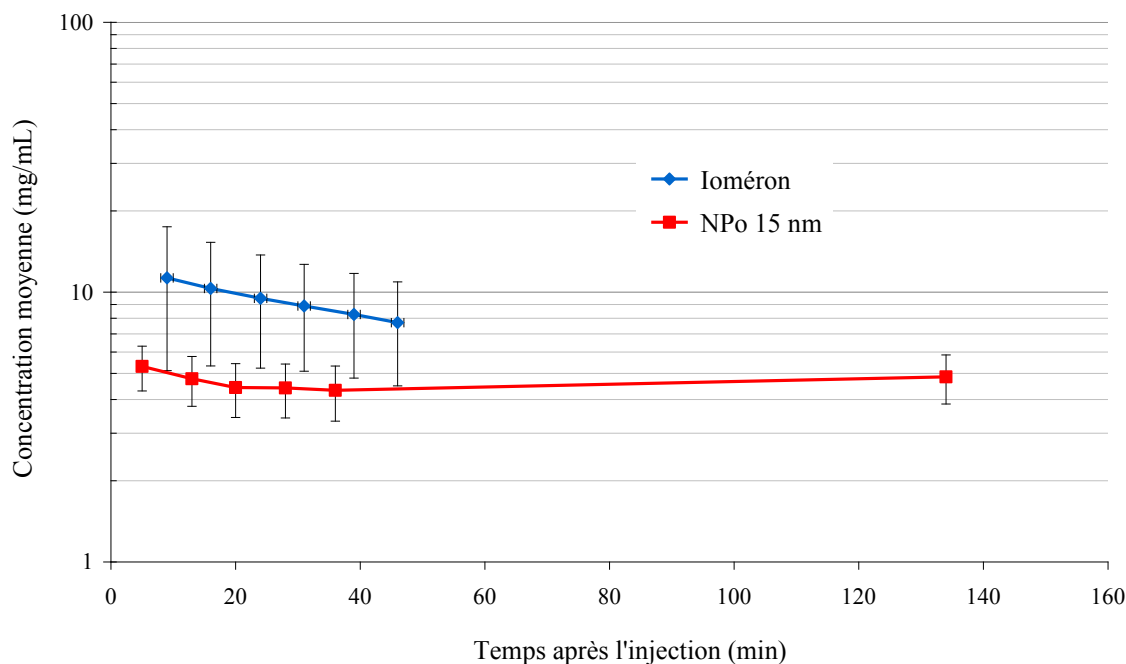


Figure 94 : Evolution de la concentration moyenne en atomes lourds en fonction du temps.

La concentration en or reste stable pour l'injection de NPo tandis que celle en iode décroît. Ces résultats corréleront le fait que l'ioméron, molécule de plus faible poids moléculaire que les NPo, diffuse dans les tissus alors que la diffusion des NPo est plus limitée.

La faible toxicité et la rétention importante des nanoparticules d'or par les tissus laissent supposer de leur efficacité en tant qu'agents photoactivants dans le cadre de la SSRT.

III.D. Evaluation du renforcement de la dose par les NPo en thérapie des gliomes

Les NPo sont donc évaluées comme composés contenant des atomes lourds pour la thérapie par renforcement de dose pour les gliomes. Tout d'abord, les conditions expérimentales sont brièvement détaillées puis les résultats obtenus lors de ces études sont décrits.

III.D.1 NPo de 1.9 nm

14 jours après l'implantation de la tumeur par voie intracérébrale dans le noyau caudé du rat dans les conditions précisées dans le Tableau 16, une injection en CED de 5 μ l de NPo

de 1,9 nm à 50 mg/ml en or est réalisée. Une étude parallèle a permis de déterminer qu'une injection de 20 μ l de NPo à 100 mg/ml induit une toxicité importante puisque tous les animaux meurent dans les 24h suivants l'injection de l'or après des crises pouvant être assimilées à de l'épilepsie.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ l 701 N, 26 sG	0,5 μ l/min	non	4 μ l	1000	7 mm puis 6,5 mm
NPo 1,9 nm	Hamilton gastight 25 μ l 1702 RN, 32 G	0,5 μ l/min	-	5 μ l	50 mg/ml en Au	7 mm puis 6,5 mm

Tableau 16 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 1,9 nm.

Les tumeurs sont imagées suite à une injection intraveineuse d'ioméron par tomographie, au moins 12h avant le traitement. Ceci permet notamment de confirmer la présence de la tumeur. Or dans cette expérience, la tumeur n'est pas visible pour tous les animaux.

Les rats sont irradiés entre 13 et 33 min après l'injection des NPo et l'énergie d'irradiation choisie pour les essais précliniques est de 88 keV.

Comme l'a rapporté Magali Edouard lors de ses travaux, pour l'irradiation des patients 80 keV est un bon compromis entre un DEF important et une bonne protection des tissus sains environnants (cerveau et os) (Cho, 2005b; Edouard, 2010; Edouard *et al.*, 2010). La tomographie réalisée juste avant et juste après l'irradiation permet de connaître la concentration au moment de l'irradiation et pour cette étude elle varie entre 6 et 16 mg/ml en or.

Les rats sont répartis en 4 groupes, un groupe ne reçoit aucun traitement, un second correspond à l'injection de l'or seul, un troisième est traité par l'irradiation seule et enfin le dernier groupe est traité par l'injection de NPo suivi d'une irradiation. Suite à l'injection de l'or, l'animal anesthésié est positionné sur un cadre en plexiglas et irradié en mode tomographique, comme décrit dans le chapitre Techniques expérimentales. Le poids ainsi que le comportement des animaux sont ensuite observés jusqu'à la mort de l'animal ou son euthanasie. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de courbe de Kaplan-Meier sur la Figure 95 et les valeurs des survies sont résumées dans le Tableau 17.

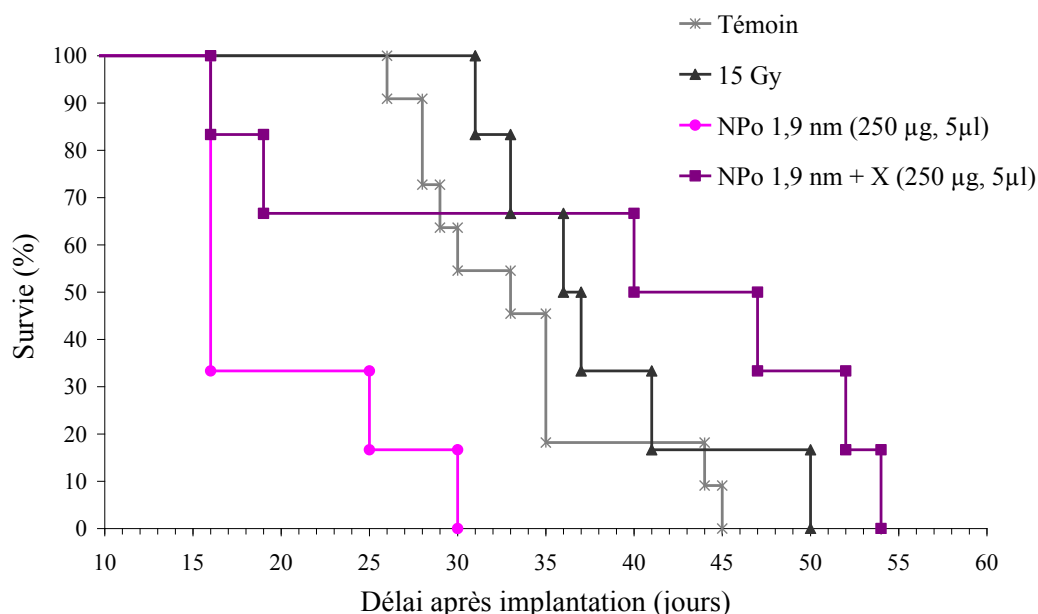


Figure 95 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par une injection intracérébrale de nanoparticules d'or 1,9 nm combinée ou non à une irradiation de 15 Gy. La chimiothérapie est administrée à J14 par CED. La radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, en mode SSR (88 keV).

Groupe	Survie (en jours)			% ILS	
	intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
témoïn	26-45	33 \pm 6	33	-	-
Npo 1,9 nm	16-30	20 \pm 6	16	-	-
15 Gy	31-50	38 \pm 7	37	15,15	12,12
Npo 1,9 nm + 15 Gy	16-54	38 \pm 17	44	15,15	33,33

Tableau 17 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats irradiés à 88 keV en présence ou non de NPo de 1,9 nm.

Alors que les rats n'ayant reçu que les NPo décèdent de façon précoce dans les 24h suivant l'injection de l'or, l'association des NPo et de l'irradiation induit une mort précoce chez 25% des rats, et une légère augmentation de la survie de 75% des rats par rapport aux rats traités par l'irradiation. L'irradiation paraît prévenir la mort des rats ayant reçu les NPo, une hypothèse proposée est la réduction de l'œdème par l'irradiation. Lors de l'étude de

toxicité sur rats sains une injection de 5 μ l de NPo à 50 mg/ml n'avait entraîné le décès que de 25% des animaux tandis qu'une injection identique entraîne la mort de 77% des animaux porteurs de tumeur. La présence de la tumeur peut donc rendre plus sensible les animaux aux NPo, mais cette différence peut également provenir du fait que les coordonnées stéréotaxiques sont différentes.

Afin de comparer l'efficacité des deux tailles de NPo, une étude semblable a été menée avec des NPo de 15 nm.

III.D.2 NPo de 15 nm

L'étude préliminaire de toxicité a permis de définir quelles concentrations et quels volumes de NPo pouvaient être utilisés sans induire de toxicité chez les rats sains. Une concentration plus importante que celle des NPo de 1,9 nm peut être utilisée au regard de la plus faible toxicité observée de ces NPo sur les rats sains. Un volume de 5 μ l et des concentrations de 25 et 50 mg/ml en or sont choisis. La toxicité pour les NPo de 1,9 nm apparaissant dans les 24h suivant l'injection de NPo, le premier jour de l'expérience seuls 2 rats ont reçu la plus grande concentration de NPo afin de contrôler que cette quantité d'or n'induisait pas de toxicité particulière chez les rats porteurs de tumeurs. Les conditions expérimentales de cette expérience sont récapitulées dans le Tableau 18.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ l 1701 SN, 32 G	14,36 μ l/min	oui	4 μ l	1000	6 mm puis 5,5 mm
NPo 15 nm	Hamilton gastight 25 μ l 1702 SN, 32 G	0,5 μ l/min	-	5 μ l	25 ou 50 mg/ml en Au	6 mm puis 5,5 mm

Tableau 18 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 15 nm.

14 jours après l'implantation de la tumeur, les rats sont traités avec une injection de NPo de 15 nm et/ou une irradiation de 15 Gy à 88 keV. Les résultats de l'étude de survie sont représentés sur la Figure 96 et résumés dans le Tableau 19.

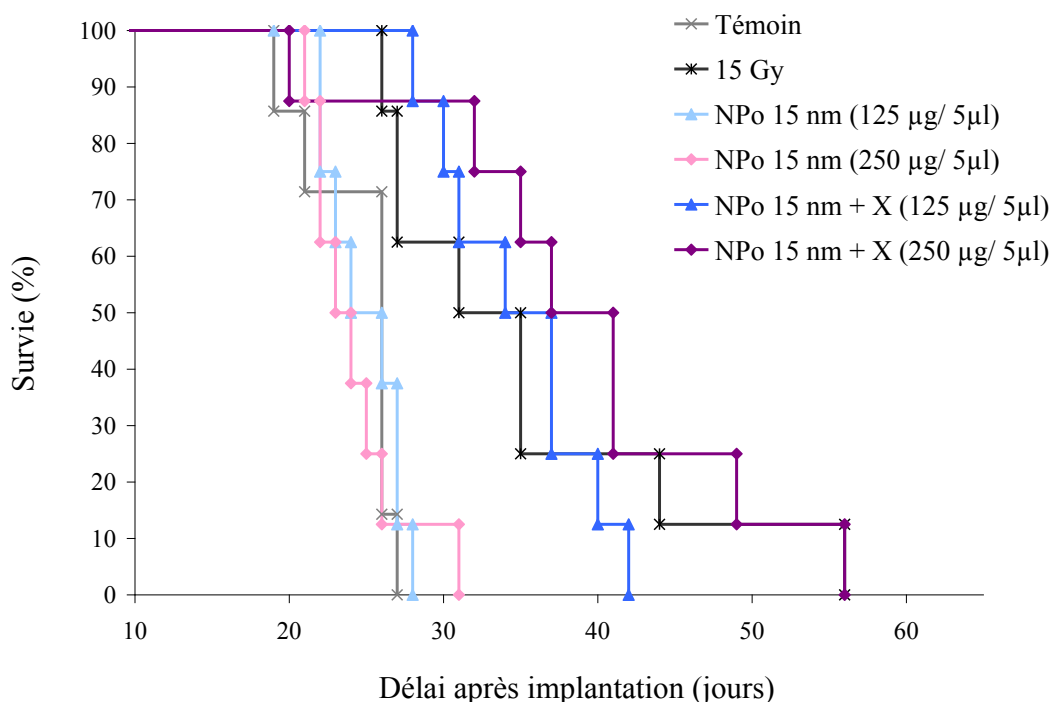


Figure 96 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par une injection intracérébrale de nanoparticules d'or 15 nm combinée ou non à une irradiation de 15 Gy. La chimiothérapie est administrée à J14 par CED. La radiothérapie est délivrée en fraction unique à J14, en mode SSR (88 keV).

Groupe	Survie (en jours)			% ILS	
	intervalle	moyenne \pm stdev	médiane	moyenne	médiane
témoin	19-27	24 \pm 3	26	-	-
Npo 15 nm (25 mg/ml)	22-28	25 \pm 2	25	4,17	-
Npo 15 nm (50 mg/ml)	21-31	24 \pm 3	24	0,00	-
15 Gy	27-56	36 \pm 11	35	50,00	34,62
Npo (25 mg/ml) + 15 Gy	30-42	35 \pm 5	36	45,83	38,46
Npo (50 mg/ml) + 15 Gy	20-56	39 \pm 11	39	62,50	50,00

Tableau 19 : Survies et pourcentages d'augmentation de survie (%ILS) des rats irradiés à 88 keV en présence ou non de NPo de 15 nm.

L'utilisation d'agarose lors de l'implantation tumorale permet d'obtenir des tailles de tumeurs plus homogènes et donc une courbe correspondante aux rats n'ayant reçu aucun traitement moins étalée.

De même que les NPo de 15 nm à ces concentrations n'entraînent pas ou peu de toxicité sur les rats sains, aucune toxicité propre aux NPo n'est observée pour les rats porteurs de tumeurs. L'analyse anatomopathologique des cerveaux permettra bien entendu de confirmer ceci. Il ne paraît donc pas y avoir de différence de toxicité selon que les rats soit porteurs de tumeurs ou non.

La médiane de survie des animaux ayant reçu la plus grande concentration de NPo de 15 nm est largement supérieure à la médiane des rats irradiés seulement, mais le traitement ne permet cependant pas d'obtenir une augmentation significative de la survie des animaux par rapport à l'amélioration apportée par l'irradiation seule.

III.D.3 Irradiation fractionnée

Le fractionnement de la dose est utilisé couramment en radiothérapie et permet une amélioration de l'efficacité du traitement. Une étude combinant une irradiation fractionnée à des injections intratumorales d'or a été réalisée. L'accès au synchrotron ne permettant pas une expérience longue de 14 jours, les irradiations ont donc été réalisées avec le générateur de rayons X à 150 kVp et une énergie effective de 50 keV. Le débit de dose est de 1 Gy/min et les animaux sont irradiés tous les jours sauf le week-end pendant deux semaines. Les injections d'or sont réalisées au jour J14, J16, J18, J22 et J24 après l'implantation des tumeurs (J0) et précèdent d'environ 4h les irradiations. Les conditions expérimentales d'implantation de la tumeur et de l'injection des NPo de 15 nm sont rapportées dans le Tableau 20.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 µl 1701 SN, 32 G	14,36 µl/min	oui	4 µl	1000	6 mm puis 5,5 mm
NPo 15 nm	Hamilton gastight 25 µl 1702 SN, 32 G	0,5 µl/min	-	15 µl	15 mg/ml en Au	6 mm puis 5,5 mm

Tableau 20 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 15 nm.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 97.

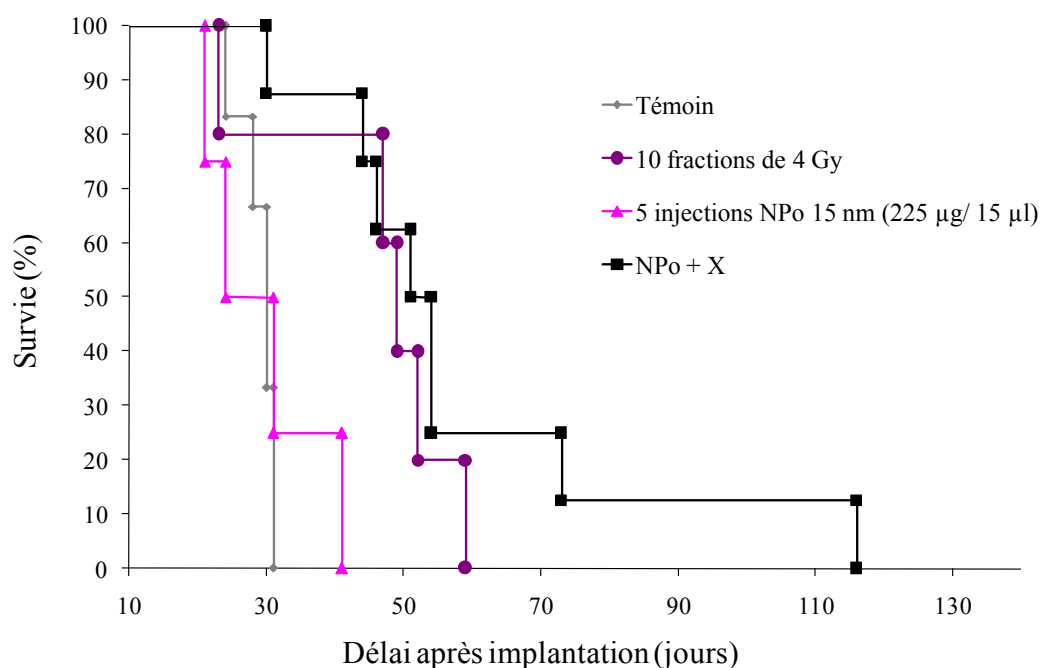


Figure 97 : Courbes de Kaplan-Meier des rats porteurs de gliome F98 traités par 5 injections intracérébrales de nanoparticules d'or 15 nm combinées ou non à l'irradiation. La chimiothérapie est administrée à J14 par CED. La radiothérapie est délivrée en 10 fractions de 4 Gy délivrée à partir de J14 et pendant 2 semaines à 150 kVp.

On peut observer que les injections répétées de NPo n'engendrent pas de toxicité sur les animaux puisque les courbes des rats témoins et des rats ayant uniquement reçu l'or ne sont pas différentes. Le traitement combinant l'irradiation en présence de NPo ne permet pas d'améliorer significativement la survie des animaux par rapport aux rats irradiés mais il faut noter que 22% animaux vivent un peu plus longtemps avec un rat vivant jusqu'à 116 jours. Les analyses anatomopathologiques devraient nous orienter sur la cause du décès. Même si ce traitement ne permet pas la guérison des animaux, une amélioration de la survie d'une partie des animaux traités est toutefois observée, ce qui souligne une efficacité sous-jacente du traitement.

L'éventuelle présence des NPo au sein des cellules des tissus tumoraux et sains a été évaluée par une étude de microscopie électronique.

III.E. Microscopie électronique

Une étude de microscopie électronique a été réalisée en collaboration avec Karin Pernet-Gallay et Julie Delaroche afin d'observer la localisation des NPo dans les tissus. Des NPo de 15 nm ont été injectées à deux groupes de 4 rats, un groupe de rats sains et un groupe de rats porteurs de tumeur. Les conditions d'injections des cellules tumorales et des solutions de NPo de 15 nm sont résumées dans le Tableau 21.

	Seringue/aiguille	Débit d'injection	Présence d'agarose	Volume	Quantité de cellules concentration	Profondeur
Cellules F98	Hamilton gastight 10 μ l 1701 SN, 32 G	14,36 μ l/min	oui	4 μ l	4000	6 mm puis 5,5 mm
NPo 15 nm	Hamilton gastight 25 μ l 1702 SN, 32 G	0,5 μ l/min	-	15 μ l	15 mg/ml en Au	6 mm puis 5,5 mm

Tableau 21 : Conditions expérimentales d'injection des cellules tumorales et des NPo de 15 nm.

11 jours après l'implantation des 4 000 cellules tumorales, temps pour lequel la tumeur a un volume semblable à celui des autres expériences, un volume de 15 μ l de NPo de 15 nm à 15 mg/ml est injecté en CED. Ensuite des groupes comportant un rat sain et un rat porteur de tumeur sont euthanasiés 1h, 4h, 24h et 6 jours après l'injection d'or. Le cerveau est ensuite prélevé et découpé à l'aide de lame de rasoir et d'une matrice en fine tranche de 1 mm d'épaisseur puis des cubes d'environ 1 mm³ sont découpés et plongés dans un grand volume de fixateur. Ces morceaux de tissus cérébraux sont ensuite réduits en section de 60 nm et enfin analysés en microscope électronique.

Aucune différence n'a été observée entre les rats sains et les rats porteurs de gliomes. Il a aussi été remarqué quels que soient les temps d'exposition aux NPo, aucune NPo n'est observée dans l'hémisphère controlatéral²². De même aucune NPo n'est localisée dans le noyau des cellules. Certaines images qui représentent les phénomènes observés pour les différents temps sont rapportées sur les Figure 99, Figure 100 et Figure 101. Les NPo correspondent sur les images à des points noirs très intenses. 1h après l'injection de l'or, très peu de NPo sont observées dans les tissus. La microscopie électronique ne permet, en effet, que l'analyse de la distribution subcellulaire des NPo. La préparation des échantillons requiert

²² Hémisphère, qui n'est pas celui dans lequel la tumeur et la solution sont injectées.

de nombreux lavages qui emportent une grande partie, si ce n'est la totalité, des NPo extracellulaires.

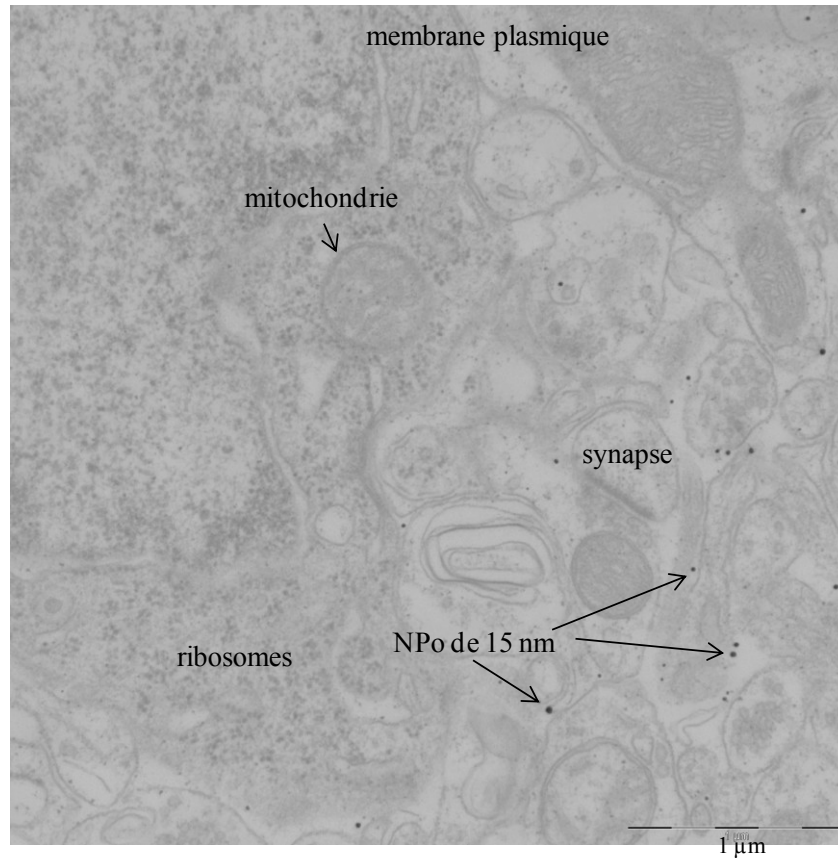


Figure 98 : Image réalisée sur des tissus sains d'un rat euthanasié 4h après l'injection des NPo de 15 nm.

La figure ci-dessus obtenue d'un tissu cérébral sain 4h après l'injection des NPo de 15 nm illustre le fait que les NPo, pour ce temps d'exposition, sont localisées dans l'espace interstitiel et sont assez isolées.

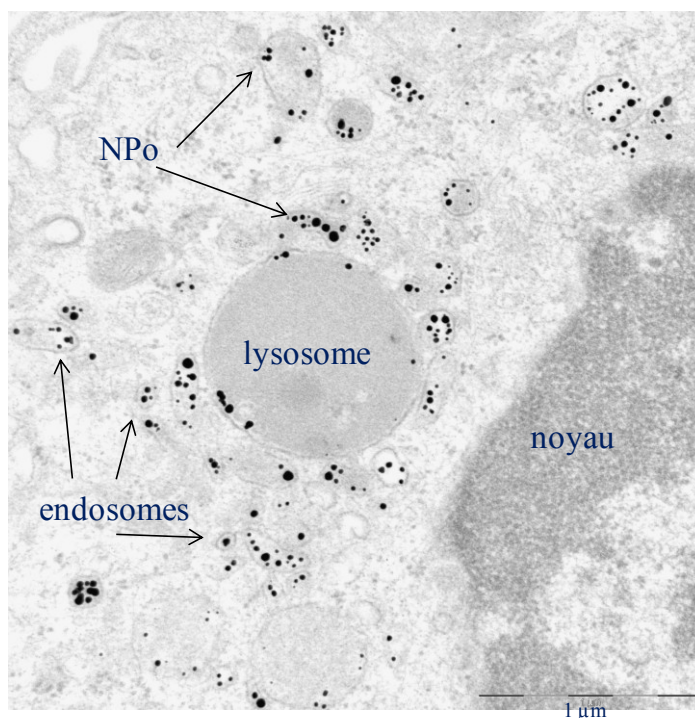


Figure 99 : Image réalisée sur des tissus tumoraux d'un rat euthanasié 24h après l'injection des NPo de 15 nm.

Sur la Figure 99, qui correspond à une image réalisée à partir d'un tissu tumoral 24h après l'injection de l'or, les NPo sont localisées dans des petites vésicules, nommées endosomes. Quelques unes sont également localisées dans le lysosome. Enfin, la localisation des NPo 6 jours après l'injection de l'or est illustrée ci-dessous.

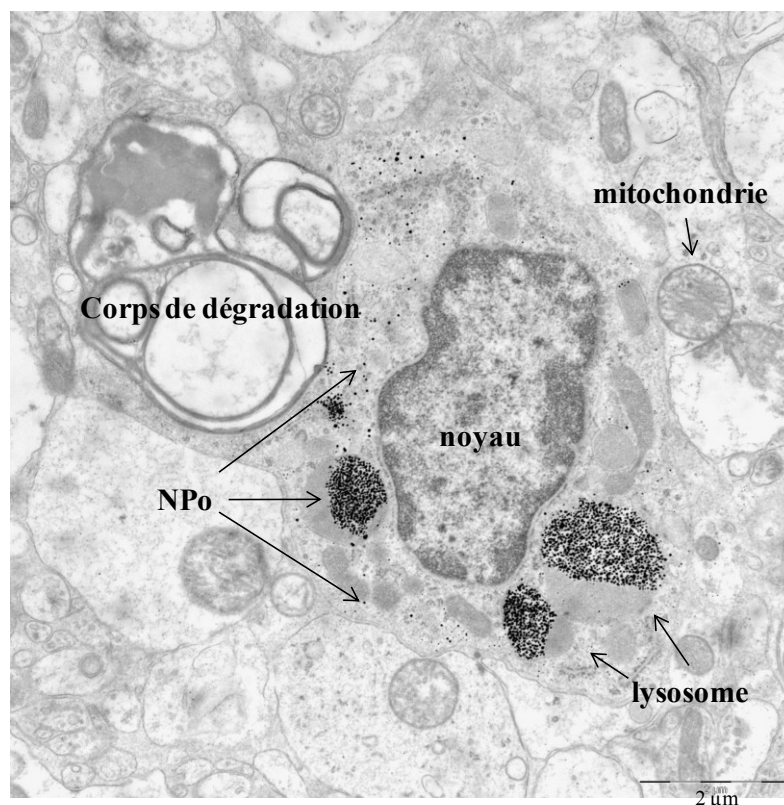


Figure 100 : Image réalisée sur des tissus tumoraux d'un rat euthanasié 6 jours après l'injection des NPo de 15 nm sur laquelle on observe les constituants d'une cellule microgiale.

Les NPo sont trouvées être concentrées dans les lysosomes et quelques unes isolées sont dans l'espace intracellulaire. Les NPo de 15 nm semblent donc suivre le chemin d'internalisation par endocytose, à savoir l'internalisation des NPo dans des endosomes puis dans des lysosomes.

Ces travaux corroborent l'étude rapportée par Chithrani sur la distribution intracellulaire des NPo dans des cellules en culture (Chithrani *et al.*, 2009). Cette étude montre que les NPo de 15 nm après leur pénétration dans la cellule sont localisées dans des vésicules et qu'une vésicule contient de nombreuses NPo. Là encore aucune NPo n'est observée dans le noyau. Une étude de suivi du déplacement en temps réel des NPo a permis de déterminer le " trajet " des NPo suite à leur pénétration dans la cellule. Les résultats sont illustrés schématiquement sur la Figure 101.

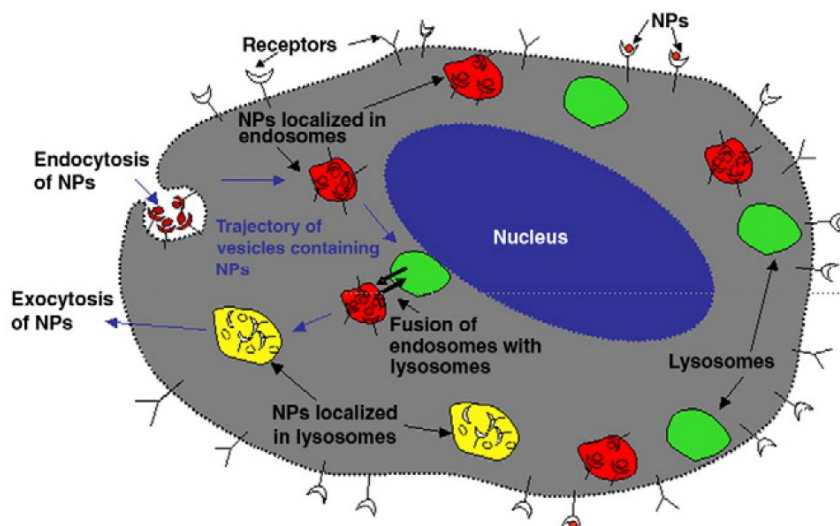


Figure 101 : Description du chemin endo-lysosomal des nanoparticules dans la cellule (Chithrani *et al.*, 2009).

Les NPo sont d'abord internalisées dans les endosomes à la suite de leur endocytose. Les endosomes fusionnent ensuite avec des lysosomes avant d'être transportés vers la périphérie de la cellule pour être excrétées.

Les observations réalisées à la suite de cette étude de microscopie laissent supposer que les NPo injectées *in vivo* dans les tissus sains et les tissus tumoraux suivent ce même mécanisme.

IV. Conclusion

Le renforcement de la dose délivrée par le rayonnement synchrotron en présence de NPo sur les cellules de gliomes de rat F98 est avéré. La toxicité limitée des NPo ainsi que leurs rétentions par les tissus permet d'accéder à des concentrations élevées en atomes lourds dans la zone tumorale au moment de l'irradiation. Le traitement des gliomes F98 par la combinaison d'une injection intracrânienne en CED et d'une irradiation de 15 Gy à 88 keV ne permet cependant pas d'observer d'augmentation significative de la survie des animaux. Le fractionnement de la dose permet d'observer une prolongation de la survie de 22% des animaux, ce qui laisse supposer un effet potentiel du traitement.

Deux hypothèses peuvent expliquer le manque d'efficacité du traitement. Elles portent toutes deux sur des difficultés liées à la distribution de l'or, qui est capitale. La présence d'or

autour de l'ensemble des cellules tumorales est en effet nécessaire pour obtenir une amélioration de la survie des animaux porteurs de gliomes F98.

Or si les images tomographiques nous permettent de déterminer que la concentration en or est homogène d'un point de vue macroscopique, la distribution microscopique obtenue dans les conditions de cette étude ne paraît pas optimale. L'analyse de microscopie électronique donne des indications sur la présence subcellulaire des NPo, mais ne permet pas de mesurer les concentrations interstitielles en or. La détection et la quantification des NPo dans le milieu interstitiel à une échelle microscopique avec un large champ de vue permettraient de déterminer l'homogénéité de la distribution d'un point de vue microscopique. Néanmoins les analyses semblent confirmer le fait que les NPo ne rentrent pas dans le noyau des cellules. Si on considère que l'ADN est une cible biologique importante de l'irradiation, la fonctionnalisation des NPo pour permettre leur localisation dans le noyau devrait être envisagée.

La seconde hypothèse porte sur un recouvrement partiel du volume tumoral par les NPo. Les concentrations conséquentes en or permettent de visualiser l'or par tomographie X. D'autre part, le volume tumoral est déterminé suite à la perfusion de la tumeur par l'iode. Ainsi la superposition de ces volumes permettrait de déterminer si le recouvrement de la zone tumorale par l'or est total ou non.

Une injection intraveineuse de NPo permettrait une distribution différente de l'or, elle n'est cependant pas envisageable au regard du coût trop important des NPo.

Conclusions et Perspectives

Les tumeurs cérébrales constituent une classe de tumeur dont la localisation particulière et le caractère agressif sont une source de difficultés thérapeutiques. Ceci s'explique, entre autres, par le haut degré de résistance intrinsèque à la chimiothérapie, qui prévaut dans un grand nombre de cas pour les tumeurs cérébrales de haut grade, et à la mauvaise distribution des drogues qu'il est possible d'obtenir par les méthodes d'injection conventionnelles. La présence de la barrière hémato encéphalique (BHE) empêche, en effet, la diffusion de nombreuses drogues de chimiothérapie qui ont pourtant fait leur preuve *in vitro* sur des lignées de cellules tumorales. La radiothérapie conventionnelle n'a pas non plus d'effet curatif sur les gliomes car la dose requise pour stériliser ces tumeurs est très proche de celle qui entraîne une radionécrose du tissu cérébral sain. Les thérapies anticancéreuses proposées n'ont, par conséquent, pas l'effet curatif souhaité et le développement de nouvelles méthodes reste hautement souhaitable. L'utilisation de sources de rayonnement potentiellement plus efficaces, ou permettant de mieux préserver les zones saines est une piste privilégiée en radiothérapie pour améliorer le gain thérapeutique.

Les objectifs de cette thèse ont été d'optimiser la méthode de photoactivation d'éléments lourds par rayonnement synchrotron, qui est développée depuis quelques années au sein de l'équipe INSERM "rayonnement synchrotron et recherche médicale". Ce travail de recherche a été conduit dans le cadre d'une collaboration étroite entre le laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques" du CEA et l'équipe INSERM U836-6 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble. Nous nous sommes en particulier intéressés à l'évaluation de différents éléments photoactivables potentiellement intéressants pour cette méthode thérapeutique. Des études ont été conduites *in vitro*, à l'échelle de l'ADN et à l'échelle cellulaire, pour mieux comprendre les phénomènes fondamentaux, et lors d'essais précliniques, conduits sur des tumeurs cérébrales implantées chez le rongeur, pour évaluer l'efficacité thérapeutique de ces différentes combinaisons.

La radiothérapie par photoactivation d'éléments lourds repose sur l'augmentation locale de dose de rayonnement induite par l'émission d'électrons secondaires générés après effets photoélectriques produits par le rayonnement X sur des éléments absorbants (iode, gadolinium, or, etc.) dont la tumeur a été préalablement chargée. Pour être efficace, la méthode nécessite d'utiliser un rayonnement X de relativement basses énergies (50-100 keV), pour

lesquelles les interactions photoélectriques ont une probabilité d'occurrence importante. L'efficacité de cette méthode dépend de nombreux paramètres tels que le choix de l'agent (numéro atomique), sa toxicité intrinsèque, sa capacité à cibler les cellules tumorales et/ou l'ADN, la quantité d'éléments absorbants présents dans la tumeur, leur localisation tissulaire, intracellulaire ou intranucléaire et l'énergie d'irradiation. Plusieurs études avaient déjà montré que cette méthode peut être appliquée en clinique si la concentration en éléments lourds présents dans la tumeur est suffisante (Boudou *et al.*, 2005; Cho, 2005a; Solberg *et al.*, 1992). Divers éléments ont été étudiés dans le cadre de cette thèse : l'iode utilisé sous forme de 5-iodo-2-désoxyuridine (IUdR) ou d'agents de contraste, des composés platinés tels que le PtTC et le carboplatine et enfin des nanoparticules d'or.

L'association du carboplatine injecté par voie intracérébrale de façon prolongée par pompes osmotiques et d'une irradiation X synchrotron (78,8 keV) avait permis d'obtenir les meilleurs résultats de survie publiés à ce jour sur le modèle très agressif de gliome F98 (Rousseau *et al.*, 2009b). L'étude conduite dans le cadre de cette thèse, dans les mêmes conditions, mais avec une source de radiothérapie conventionnelle (6 MV) a permis d'obtenir des résultats similaires. Une étude menée en parallèle aux États-Unis par notre collaborateur Rolf Barth (Columbus University, USA) a confirmé ces résultats (Yang *et al.*, 2010). Bien que l'efficacité du traitement ne soit pas liée à l'effet photoélectrique sur les atomes de platine, ces résultats sont de première importance pour le traitement des tumeurs cérébrales. Un essai clinique, établi sur la base de nos travaux de recherche, est actuellement en cours d'élaboration aux États-Unis (Columbus University). La possibilité d'employer un rayonnement conventionnel offrant les mêmes résultats thérapeutiques que le rayonnement synchrotron (bien que décevante en premier lieu pour nous) élargit grandement le champ d'applications de ce traitement. L'objectif premier de l'utilisation du cisplatine et du carboplatine était d'induire des dommages importants directement au sein de l'ADN grâce aux électrons Auger issus principalement de l'ionisation des couches internes des atomes lourds. La cytotoxicité propre de ces éléments platinés ne permet pas d'accumuler suffisamment de platine pour obtenir une photo activation efficace. Le PtTC a permis d'augmenter la quantité de platine intégrée dans les cellules au moment de l'irradiation par rapport à l'utilisation du carboplatine. Une très légère augmentation de la dose a ainsi été observée *in vitro* et *in vivo*. La présence des atomes de platine au sein du cytoplasme et non au sein du noyau laisse penser que pour cibler l'ADN, il serait peut être plus efficace d'utiliser un rayonnement X d'énergie plus élevée de sorte à obtenir des photoélectrons ayant une plus

grande trajectoire. Une étude complémentaire d'évaluation du taux d'incorporation du PtTC en fonction des temps d'exposition *in vivo* serait aussi nécessaire pour optimiser les conditions expérimentales précliniques.

L'IUdR s'incorpore quant à lui dans l'ADN lors de la réplication cellulaire, ciblant ainsi de façon passive les tissus à renouvellement rapide et donc les tissus tumoraux en particulier dans le cas des tumeurs cérébrales. Sa présence au sein de l'ADN permet d'observer une augmentation de la dose considérable *in vitro*, supérieure à celle obtenue avec 10 mg/mL d'iode sous forme d'agent de contraste "ioméron". Malgré ces bons résultats obtenus *in vitro*, l'unique essai préclinique réalisé dans le cadre de la thèse de Julia Rousseau n'avait pas permis d'observer une augmentation significative de la survie des animaux.

Des perspectives d'amélioration de ce traitement pourraient être d'évaluer une irradiation fractionnée, combinée à une injection intracérébrale prolongée d'IUdR, comme suggéré par les travaux de Doiron menés avec le BrdU et différents schémas d'irradiations fractionnées. Dans ces études, aucune amélioration de la survie n'avait été observée lorsqu'une seule fraction d'irradiation était délivrée, mais 5 et 10 fractions combinées au BrdU, avaient permis d'augmenter significativement la médiane de survie des animaux traités. Le BrdU est un analogue de l'IUdR, et son efficacité en combinaison avec un rayonnement de haute énergie fractionné laisse penser que l'IUdR combiné avec un rayonnement de basses énergies fractionné pourrait aussi permettre d'observer une amélioration de la survie puisque les conséquences des effets photoélectriques viendraient s'ajouter à ceux des effets de la radiosensibilisation des tissus par l'IUdR.

D'autre part, l'utilisation combinée d'IUdR et d'ioméron pourrait être une piste intéressante à explorer. En effet, nous avons observé *in vitro* que leur combinaison permet d'obtenir des effets additifs (Corde *et al.*, 2004). Il serait intéressant de mener des études complémentaires *in vivo*, leurs mécanismes d'action étant différents.

Dans la dernière partie de la thèse nous avons évalué la capacité des nanoparticules d'or à induire une augmentation de dose. Les travaux de recherche pour utiliser les nanoparticules dans le cadre du traitement des cancers ont été largement développés depuis quelques années et cette approche semble très prometteuse. Les nanoparticules métalliques sont d'excellents candidats pour plusieurs raisons : leur taille peut facilement être contrôlée dans une gamme de 1 à 200 nm; elles sont biocompatibles et leur surface peut être modifiée simplement. Ces nanoparticules peuvent ainsi jouer un double rôle thérapeutique et de

diagnostic. Dans le cadre de la radiothérapie par photoactivation, les nanoparticules d'or sont intéressantes car elles permettent d'obtenir des atomes lourds en quantité importante, de manière non (ou peu) toxique, près de l'ADN ou à proximité immédiate des cellules tumorales. L'efficacité de la photoactivation des NPo de 1,9 et 15 nm a été observée sur le modèle F98. *In vitro*, la toxicité des NPo de 1,9 nm sur les cellules F98 après 24h d'incubation n'est pas très élevée (survie spécifique 80%) tandis que pour un temps d'incubation identique, les NPo de 15 nm présentent une toxicité beaucoup plus importante avec un taux de survie de l'ordre de 30 à 40%, révélant une toxicité considérablement plus élevée des NPo de plus grande taille. Nous avons observé une faible augmentation de dose lorsque les cellules sont exposées aux NPo d'or puis rincées (SER = 1,22 et 1,16 pour les NPo de 1,9 nm et 15 nm, respectivement) tandis qu'une augmentation de dose plus conséquente a été observée lorsque les cellules sont irradiées dans une solution contenant des NPo à une concentration de 10 mg/mL en or (SER = 1,92 et 1,40 pour les NPo de 1,9 nm et 15 nm, respectivement). A concentration égale en atomes lourds, les NPo induisent *in vitro* une sensibilité des cellules F98 plus importante que celle observée avec l'ioméron. L'utilisation d'atomes lourds sous forme de nanoparticules semble donc être une solution intéressante. Les nanoparticules présentent également l'avantage de pouvoir véhiculer un agent d'imagerie ou bien une molécule d'intérêt biologique permettant le ciblage des cellules tumorales.

Des études précliniques ont permis d'évaluer la biodistribution intracérébrale des nanoparticules d'or, par imagerie quantitative tomographique X. La microscopie électronique nous a quant à elle renseigné sur la localisation subcellulaire des NPo. Une technique permettant de déterminer la distribution microscopique à l'échelle tissulaire/cellulaire, permettrait de compléter ces analyses et de vérifier si l'on obtient une répartition homogène des NPo au sein ou au voisinage de toutes les cellules tumorales. En effet, ce point est un élément clef de la réussite du traitement, car si toutes les cellules tumorales ne sont pas à proximité d'une quantité suffisante de NPo, la tumeur peut croître à nouveau à partir de quelques cellules isolées non détruites. Dans ce modèle tumoral, il a en effet été montré qu'il suffit de 10 cellules tumorales F98 pour induire la létalité (Barth and Kaur, 2009).

Hainfeld et ses collaborateurs ont rapporté d'excellents résultats de survie sur un modèle de tumeur implantée en sous-cutanée chez des souris. Une injection intraveineuse de nanoparticules d'or (Aurovist 1,9 nm), suivie d'une irradiation X de moyennes énergies (250 kVp) a considérablement réduit le développement tumoral, conduisant à un taux de survie de 86% pour le groupe ayant reçu une dose de 2,7g Au/kg et 26 Gy, contre 20% de survie pour le groupe seulement irradié et 0% pour le groupe ayant reçu l'injection seule d'or

(Hainfeld *et al.*, 2008; Hainfeld *et al.*, 2004). Afin d'évaluer l'efficacité d'une association de NPo et d'un rayonnement de basse énergie en thérapie des gliomes, des essais précliniques sur des rats porteurs de tumeurs F98 ont été réalisés. Le franchissement de la BHE étant un obstacle important, les NPo ont été injectées par voie intracérébrale par CED. Aucune donnée n'étant encore disponible concernant la toxicité des NPo suite à une injection intracérébrale, la toxicité des NPo de 1,9 et 15 nm sur des rats sains a été évaluée. Contrairement à ce que nous avons observé *in vitro*, les nanoparticules de 15 nm se sont révélées être moins toxiques *in vivo* que les NPo de 1,9 nm. L'essai thérapeutique conduit sur le modèle F98 avec les nanoparticules de 1,9 nm a montré une toxicité importante du traitement (50 mg/mL, 5 μ L), puisque tous les animaux ayant reçu l'injection de nanoparticules seule décèdent avant les premiers témoins. Quelques animaux ayant reçu la combinaison NPo et irradiation vivent cependant plus longtemps que les rats irradiés seulement, mais pas de façon significative. L'étude préclinique réalisée avec les NPo de 15 nm montre que ces nanoparticules sont moins toxiques. Une faible augmentation de la médiane de survie des animaux est observée dans les traitements combinés, mais la encore les différences ne sont pas significatives et nous n'avons pas observé de survivants à long terme.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Hainfeld et collaborateurs sur le modèle de tumeurs sous cutanée et soulignent la grande difficulté du traitement des tumeurs cérébrales, tant au niveau préclinique qu'en clinique. La présence de la barrière hémato encéphalique et la sensibilité particulière du tissu cérébral aux drogues, en font des obstacles redoutables. Des concepts qui font leur preuve *in vitro* ou sur d'autres modèles tumoraux ne sont pas aussi efficaces sur les tumeurs cérébrales ou nécessitent davantage d'optimisation.

Le modèle F98 qui se rapproche des gliomes de haut grade humains, est également très résistant. Des études rapportant l'efficacité de traitement sur différents modèles de gliomes permettent d'illustrer cette résistance du modèle F98. Une étude récente de Recinos rapporte en effet une grande efficacité du traitement combinant le témozolomide et la carmustine sur le modèle 9L, avec 87% des rats survivants à long terme alors que les mêmes conditions de traitement n'engendrent que 14% de rats survivants à long terme pour les gliomes F98 (Recinos *et al.*, 2010). Les travaux de Samnick exposent également une réponse du modèle F98 beaucoup moins importante au traitement, associant l'injection d'un dérivé d'acide aminé à une irradiation X, que des glioblastomes humains implantés chez le rat (Samnick *et al.*, 2009). L'agressivité de ce modèle implique qu'une faible augmentation de la survie constitue déjà en tant que tel un résultat positif et encourage à optimiser les facteurs

pour obtenir une amélioration de la survie plus conséquente. La distribution des atomes lourds est un point capital pour le développement de la SSRT. Ce modèle implique de n'épargner aucune cellule tumorale. La distribution et donc les méthodes d'injection doivent encore être étudiées afin d'être optimisées.

Matériels et méthodes

Les agents anticancéreux platinés ont été fournis par la pharmacie du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble. Les produits commerciaux utilisés au cours de ce travail sont les suivants :

Aurothioglucose (Sigma, France),
Carboplatine (10 mg/ml ;Teva ® Classics., Paris, France),
Cisplatine Merck ® (100 mg/100 ml ; Merck génériques, Lyon, France),
Cisplatyl ® (cisplatine 10 mg/10 ml ; Laboratoire Aventis, Paris, France),
Crystal violet (Sigma, France),
Doléthol (Vétoquinol),
Eloxatine ® (oxaliplatine 5 mg/ml ; Sanofi - Synthélabo, France),
Glucose Aguettant 5 % (Laboratoire Aguettant, Lyon, France),
Ioméprol 350 ® (ioméron, Bracco Altana Pharma, Constance),
Isoflurane (Belamont, Cournon),
Nanoparticules d'or de 1,9 et 15 nm (Nanoprobes, New York, USA),
Ocry-gel (Laboratoire TVM, Lempdes, France),
Paxman (Virbac Santé Animale).

I. Etudes cellulaires

- **Produits et Matériels :**

Le milieu de culture : DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X), liquid (high glucose), with GlutaMAX™ I, 4500 mg/L D-glucose, Sodium Pyruvate), le sérum de veau fœtal, la pénicilline-streptomycine et le PBS 1X (sans CaCl₂ et MgCl₂) proviennent d'Invitrogen, France. Le DMSO pour la congélation provient de Sigma-Aldrich. Les différentes flasques de culture, boîtes de Pétri, pipettes et tubes proviennent de chez Dutcher. La lignée cellulaire F98 vient de chez ATCC.

I.A. Repiquage des cellules

Les cellules F98 sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal et 1% de mélange d'antibiotiques (nommées par la suite « milieu complet »). La

croissance de ces cellules adhérentes se fait dans une atmosphère à 5% de CO₂ à 37°C (incubateur). Leur temps de doublement *in vitro* est d'environ 19 heures.

Ces cellules sont rincées avec du PBS puis de la trypsine-EDTA est ajoutée dans la flasque, et une période de 5 min à 37°C permet le décollement des cellules de leur support. Ensuite du milieu de culture complet est ajouté arrêtant ainsi l'action de la trypsine. Cette solution cellulaire est ensuite centrifugée à 1500 g pendant 5 min à température ambiante. Enfin le culot cellulaire est repris dans du milieu complet et distribué dans plusieurs flasques contenant du milieu complet.

I.B. Congélation des cellules

Les cellules sont décollées grâce à la tripsine (comme décrit ci-dessus), puis le culot cellulaire est repris dans 2 ml de milieu contenant 10% de DMSO que l'on transfère dans un cryotube. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation, contenant de l'isopropanol qui permet une diminution lente de la température des cellules (1°C/min), cette boîte est placée dans un congélateur à – 80°C. Le lendemain, les cryotubes sont placés dans un Dewar d'azote liquide (- 196°C) ce processus permet une conservation longue durée des cellules.

I.C. Irradiation des cellules

Les cellules sont décollées de leur support comme décrit ci-dessus, puis le culot cellulaire est repris dans du milieu cellulaire contenant ou non un volume d'agent. La solution cellulaire est placée soit dans un cryotube de 2 ml, à l'exception des NPo qui sont irradiées dans des capillaires. En effet ces composés contiennent chers et des volumes de solutions réduits sont donc nécessaires. Les cryotubes et les capillaires sont irradiés à l'horizontal, mais seuls les cryotubes sont en rotation pendant l'irradiation.

I.D. Test de clonogénicité

Après irradiation, 10 µl de la solution sont prélevés et placés sur une cellule de Neubauer. Si la solution cellulaire irradiée contient un agent radiosensibilisant, la solution est centrifugée à 1500 g pendant 5 min puis reprise dans du milieu de culture. Les cellules sont comptées au microscope, ensuite la solution est diluée avec du milieu complet afin de pouvoir obtenir la quantité de cellules à ensemercer dans un volume variant de 5 à 200 µl. Aux boîtes

de Pétri de 10 cm, préalablement identifiées et contenant 8 ml de milieu DMEM complet, on ajoute le volume de solution cellulaire défini préalablement. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées dans un incubateur (atmosphère à 37°C avec 5% de CO₂). Après 11 ou 12 jours de croissance des colonies, les boîtes sont sorties de l'incubateur, le milieu de culture est vidé, les boîtes sont rincées avec du PBS 1x et 2 ml d'une solution de crystal violet (25% crystal violet et 75% d'éthanol à 95%) est ajouté et laissé pendant 1 min. Les boîtes sont ensuite rincées avec de l'eau et mises à sécher à l'air libre. Il ne reste plus qu'à compter les colonies de plus de 50 cellules.

I.E. Test des comètes

Tous les composés utilisés dans cette technique proviennent de chez Sigma-Aldrich.

Les lames sont préparées la veille ou 1 heure avant l'expérience. 100 ml de solution d'agarose à 1% sont préparés. Pour ceci 1 g d'agarose est ajouté à 100 ml de PBS, puis l'agarose est fondu en chauffant la solution au micro-onde. La solution est versée dans un bécher haut de 50 ml que l'on garde au chaud sur une plaque chauffante. Les lames sont trempées dans la solution, puis elles sont déposées sur la paillasse afin de sécher à l'air libre. Ensuite 60 mg d'agarose low melting point sont dissous dans 10 ml de PBS et gardé au chaud sur une plaque chauffante. 450 µl d'agarose sont ajoutés à plusieurs tubes de 1,5 ml, qui sont ensuite placés au bain-marie, préalablement réglé à 37°C. Le tampon d'électrophorèse est préparé en ajoutant 30 g de pastilles de soude dans 2,5L d'eau distillée et 5 ml d'EDTA (0,5 M, pH = 8). Le mélange est agité jusqu'à dissolution complète des pastilles puis placé au réfrigérateur jusqu'à l'utilisation.

Ensuite les cellules sont placées dans un bain marie à 37°C afin de les décongeler. Dans nos études les cellules sont comptées avant congélation. Après décongélation, 600 µl de la solution cellulaire sont prélevés et centrifugés à 1500 g pendant 5 min. Puis pour obtenir une concentration de l'ordre de 300 000 cellules dans 200 µl, on reprend le culot cellulaire dans 200 µl de PBS. Ensuite 50 µl de ces suspensions cellulaires sont ajoutés aux tubes contenant l'agarose low melting point conservé à 37°C. Après mélange par pipetages répétés, 100 µl du mélange sont ensuite déposés sur une lame, puis une lamelle est immédiatement déposée sur la lame. 3 lames sont préparées pour chaque condition. Les lames sont déposées 10 min sur la glace. L'étape de lyse cellulaire est ensuite réalisée. Pour ceci, après retrait des lamelles, les lames sont placées dans une boîte (environ 12 lames par boîte) puis elles sont recouvertes délicatement de 75 ml de tampon de lyse. Ce tampon est préparé en deux fois.

146,1 g de NaCl et 1,2 g de tris sont pesés et dissous dans 200 ml d'EDTA à 0,5 mM, puis le pH est ajusté à 10 avec de la soude concentrée avant d'ajouter 10 g de sodium lauryl sulfate et enfin le volume de la solution est ajusté à 1L, la solution est agitée et conservée une nuit à température ambiante avant utilisation. Au moment de l'utilisation de ce tampon, à 133 ml de tampon préparé préalablement est ajouté 15 ml de DMSO et 1,5 ml de triton. 1 heure après l'ajout du tampon, le tampon est aspiré, puis les lames sont rincées avec le tampon de rinçage dilué à 0,4 M de tris. Ce tampon de rinçage est préparé en dissolvant 145,5 g de Tris dans 800 ml d'eau distillé, ensuite le pH de ce mélange est ajusté à 7,4 avec de l'HCl concentré et enfin le volume de la solution est complété jusqu'à 1 litre avec de l'eau (1,2 M de tris). Ce tampon est conservé au réfrigérateur et est dilué au tiers avant utilisation. Les lames sont ensuite déposées dans la cuve d'électrophorèse et recouvertes de tampon d'électrophorèse. Après un temps de stabilisation de 40 min, l'ADN migre pendant 40 min sous une tension de 25 V et une intensité de 300 A. L'ajout ou le retrait de tampon de migration permet d'ajuster la tension de migration. A la fin de la migration, le tampon est aspiré, les lames sont déposées dans des boîtes et elles sont rincées 3 fois avec 50 ml de tampon de rinçage. Ensuite, elles sont séchées 5 min à l'air. 10 µl d'une solution mère de BET à 10 mg/ml est dilué dans 3 ml de PBS. 50 µl de cette solution est déposé sur chaque lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle. Les lames sont déposées dans une boîte, dans laquelle on a déposée du papier absorbant humidifié et du papier aluminium. Elles peuvent ainsi être conservées à 4°C avant la lecture.

La lecture se fait grâce à un microscope à fluorescence et au logiciel Comet Assay IV. 50 cellules sont analysées par lame.

II. Etudes sur les animaux

Tous les animaux de cette thèse sont des rats syngéniques Fischer males qui proviennent de chez Charles Rivers Laboratories.

II.A. Préparation des cellules pour implantation (1 000 cellules dans 4 µl)

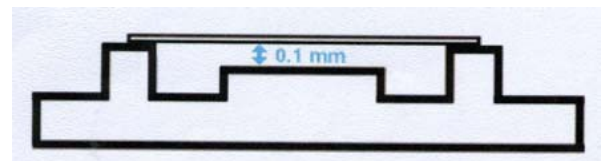
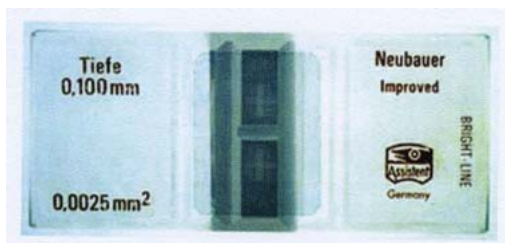
- **sans agarose :**

Les cellules sont cultivées comme décrit précédemment, dans des flasques T25 cm³. Le milieu de culture est aspiré, les cellules sont rincées avec 2 ml de PBS, puis 1 mL de

trypsine est ajouté avant de placer la flasque 5 minutes à 37°C. Une vérification au microscope est effectuée pour s'assurer que les cellules soient bien décollées. Un mélange de 20 ml de PBS et 500 µl de SVF est préparé dans un tube falcon. 4 ml de ce mélange est ajouté dans la flasque, et l'ensemble est transféré dans un tube de 50 ml. La flasque est rincée avec 2 ml de PBS qui sont ajoutés à la solution cellulaire.

La solution est homogénéisée par pipetage successifs, un peu de la solution est prélevée et déposée sur un hémocytomètre (appelé aussi cellule de Neubauer) qui permet de compter la quantité de cellules dans 1 µl de solution. En parallèle, le tube est centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes.

- **Montage de la cellule de comptage et comptage des cellules**



Les berges de la cellule sont humectées avec un peu d'eau. La lamelle est glissée sur ces berges en assurant son adhérence par pression des pouces. Après 5 minutes, 10 µl environ de solution sont déposés à l'aide d'une micropipette sous la lamelle.

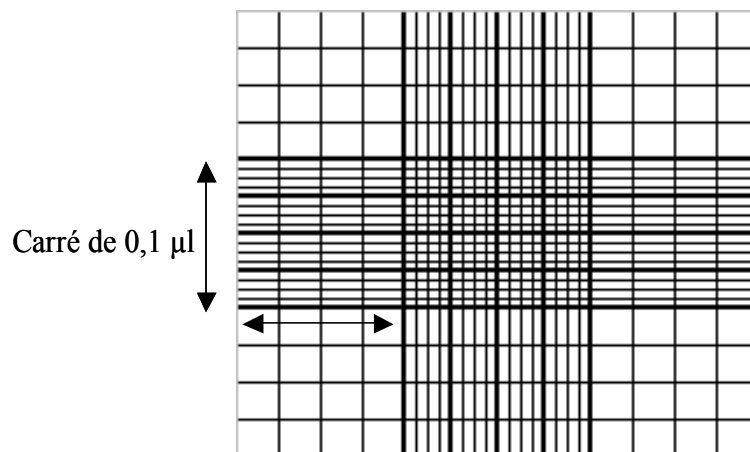


Figure 102 : Quadrillage de la cellule de Neubauer.

Le nombre de cellules dans 2 ou 3 carrés de 0,1 µl est compté grâce au microscope, puis la moyenne est calculée. La quantité totale de cellule dans la solution de départ est

calculée. La densité finale à obtenir est 1000 cellules dans 4 μ l, soit une concentration de 250 000 cellules/ml. Le volume, dans lequel on doit reprendre le culot cellulaire pour obtenir cette concentration, est calculé.

Un mélange de 50 ml de milieu DMEM et 500 μ l d'antibiotiques est préparé pour remettre le culot cellulaire en suspension. Ensuite, la solution est homogénéisée par pipetage successifs. Enfin, afin de vérifier que les dilutions sont correctes et que l'ordre de grandeur est respecté, le nombre de cellule dans la solution finale est recompté, la moyenne de cellules à compter est de 25 cellules dans 0,1 μ l.

- **avec agarose :**

5 ml de milieu de culture DMEM est chauffé à 37°C (bain-marie). Entre 60 et 70 mg d'agarose low melting point est pesé, et ajouté aux 5 ml de milieu préalablement chauffé. Le tout est porté à 70°C (avec un bain marie) pendant 20 minutes, puis quand l'agarose est bien solubilisé mettre à 37°C jusqu'à l'utilisation.

La préparation des cellules se fait selon le même protocole que pour les cellules sans agarose (voir ci-dessus) jusqu'à l'étape de centrifugation après le comptage des cellules.

Le culot cellulaire est repris dans le volume de milieu calculé, puis après homogénéisation, 1 ml de cette solution est transféré dans un autre tube et centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes. Un peu de cette solution est prélevé avant la centrifugation afin de compter le nombre de cellule pour s'assurer que la densité cellulaire est conforme à celle désirée. Enfin, le culot cellulaire est repris dans 1 ml d'agarose et 10 μ l de PS, homogénéiser puis remis à 37°C jusqu'au prélèvement pour l'implantation.

II.B. Implantation des cellules dans le cerveau du rat

Le rat est pesé, une brève anesthésie est induite en le plaçant dans une cuve contenant de l'isoflurane (5%), ensuite un mélange d'anesthésique/analgésique (4 ml de kétamine, 2,5 ml de xylasine et 3,5 ml d'eau ppi) est injecté en intrapéritonéale (0,2 ml/100 g) et enfin l'animal est placé dans une couveuse à 27°C.

Le dessus du crane est rasé, un gel oculaire lubrifiant est appliqué sur les yeux du rat, puis le rat est positionné sur le cadre stéréotaxique (Kopf®). Le dessus du crane est badigeonné avec de la bétadine avant l'incision de la peau avec un scalpel. L'ouverture est maintenue en plaçant deux masselottes pour maintenir la peau et dégagée la zone de travail. Après avoir bien repéré le bregma, à l'aide des translations micrométriques du cadre, on se

place à 3,5 mm à droite du centre du bregma, puis l'os est percé, par frottement avec un poinçon bien aiguisé. La seringue d'injection est préparée, en la rinçant plusieurs avec de l'eau ppi, puis avec la solution cellulaire préalablement agitée. La seringue est remplie et placée sur le cadre en s'assurant que le biseau de l'aiguille est bien tourné vers la droite. On fait perler pour s'assurer que le piston est bien en butée et que de l'air ne sera pas injecté. L'aiguille est positionnée au dessus du trou, puis avec la translation verticale du cadre l'aiguille est descendue dans le noyau caudé jusqu'à 6 mm de profondeur, puis elle est remontée de 0,5 mm afin de créer une « poche » dans laquelle seront déposées les cellules tumorales. Les cellules sont injectées en CED grâce à une pompe à seringue à perfusion (modèle KDS 310, GENEQ inc., Montréal, Québec, Canada). Si les cellules sont dilués avec de l'agarose, il faut attendre 5 min avant d'injecter afin de permettre à l'agarose de gélifier. 4 μ l de milieu DMEM (sans sérum et avec des antibiotiques) contenant 1000 cellules F98 sont injectées avec un débit de 0,5 μ l/min à l'aide d'une pompe. Pour les cellules avec agarose, le débit est de 16,4 μ l/min. La seringue est laissée en place pendant 1 min après l'injection avant d'être remonté doucement. Le trou dans l'os est comblé avec de la cire à os et enfin le scalp est désinfecté puis suturé. Jusqu'à leur réveil les animaux sont placés dans la couveuse.

Remarques : Certaines conditions (profondeur d'injection, débit d'injection, seringue, quantité de cellules) sont fonction des expériences elles seront donc rappelées pour chaque étude dans le chapitre résultat.

II.C. Injection intracérébrale en CED

Les injections intracérébrales CED des solutions sont réalisées de la même façon que l'injection des solutions cellulaires. Le type de seringue, le volume de la solution, sa concentration, la présence d'agarose et la profondeur et le débit d'injection sont rapportés pour chaque expérience.

II.D. Pompes osmotiques

Les pompes osmotiques ALZET, modèle 2001, (diamètre 0,7 mm et longueur 3 cm, volume du réservoir 200 μ l, débit 1 μ l/h pendant 7 jours) sont achetées chez Charles Rivers Laboratories (L'Abresles, France). Le kit d'infusion cérébrale constitué d'une canule (diamètre interne : 0,18 mm et diamètre externe : 0,36 mm) et d'un cathéter en vinyle est acheté chez Bilaney (Dusseldorf, Allemagne).

La solution de dextrose à 5% provient du Laboratoire Aguetant (Lyon, France).

II.D.1 Préparation des pompes osmotiques

La solution à injecter est préparée, 24h avant la pose des pompes. Dans ce travail les pompes osmotiques sont utilisées pour injecter une solution de carboplatine. La solution finale de carboplatine doit être à 0,5 mg/ml dans du glucose à 5%. On dilue donc 500 µl de solution mère à 10 mg/ml dans 9,5 ml de glucose à 5%.

On prépare ensuite les pompes au maximum 24h avant leurs utilisations. Des tubes falcons (le même nombre que de pompes à préparer) sont remplis avec une solution de NaCl à 0,9%. Ensuite, sur un morceau de papier aluminium, des morceaux de tubulure de 5,5 cm de long sont coupés avec une lame de scalpel. Le fil en aluminium est retiré de la canule d'injection. Le morceau de tubulure est fixé sur la canule d'injection. La « tête » de la canule d'injection est coupée. Le modérateur de flux est introduit dans l'autre extrémité de la tubulure. Le réservoir de la pompe est rempli avec une aiguille fourni dans le kit, la pompe est posée dans un bouchon de falcon. Le niveau de remplissage de la pompe est vérifié en se plaçant à la lumière pendant le remplissage. L'aiguille est ressortie lentement du réservoir de la pompe en même temps que la pompe se remplit afin de ne pas insérer de bulles d'air dans le corps de la pompe. Le système : canule d'injection, tubulure et modérateur de flux est rempli de la même façon. Enfin, le modérateur de flux est inséré dans le corps de la pompe, si celle-ci est bien rempli, du liquide s'échappe au niveau de la canule d'injection. L'ensemble est ensuite introduit dans un falcon contenant une solution de NaCl, le réservoir étant dans le fond du tube afin d'amorcer la pompe. Enfin tous les tubes falcons sont placés dans un bain-marie à 37°C jusqu'à leurs utilisations.

II.D.2 Pose des pompes osmotiques

Le rat est endormi par une injection intrapéritonéale d'un mélange kétamine/xylasine après une induction à l'isoflurane. Les fils de suture restants sont retirés. L'animal est tondu largement du nez jusqu'au haut du dos. Les yeux sont protégés de la sécheresse par un gel oculaire lubrifiant (ocrygel). L'animal est placé sur le cadre stéréotaxique. Un champ stérile est plié en 4 et la pointe est découpée. Le champ stérile est placé sur la tête du rat et fixé avec des clamps. Le champ de travail est badigeonné avec de la bétadine. Une incision nette avec un scalpel est réalisée sur l'incision précédente. Des masselottes sont placés afin d'écarter la peau du rat et de dégager la zone de travail. De la bétadine est appliquée sur le crane. Une

canule est insérée sous la peau du dos afin de décoller celle-ci et créer un espace pour le corps de la pompe. Une paire de ciseaux recourbés (pointes vers le haut) permet de créer l'espace nécessaire. La cire à os est retirée avec une petite aiguille. Une pompe est sortie du tube avec une pince et posé sur du papier aluminium. Le corps de la pompe est inséré sous la peau du dos. La partie du crane sur laquelle la canule est collée, est séchée. Un peu de colle chirurgicale (conservée à 4°C) est appliquée sur la canule d'injection. La tubulure est introduite délicatement et la canule d'injection est insérée dans le trou du crane et appliquée avec une pince en veillant bien à ce que la tubulure parte bien vers la queue et fasse une boucle qui permettra la liberté des mouvements de l'animal. La pression sur la canule est maintenue pendant 1 minute. Le scalp est désinfecté à la bétadine puis suturé en faisant attention à ne pas piquer la tubulure. Du gel oculaire est appliqué sur les yeux de l'animal avant de la placer dans une couveuse à 27°C.

II.D.3 Retrait des pompes osmotiques

Le rat est endormi comme précédemment. Les fils de suture restant sont retirés. L'animal est tondu. Du gel oculaire lubrifiant est appliqué sur ses yeux. L'animal est placé sur un cadre stéréotaxique, de la bétadine est appliquée sur la tête. Une incision nette est réalisée avec un scalpel. Les masselottes sont placées pour écarter la peau et de la bétadine est appliquée sur le dessus du crane. Le corps de la pompe est retiré avec une pince. La canule d'injection est décollé du crane à l'aide d'un scalpel et le trou est rebouché avec de la cire à os. L'incision est suturée et de la bétadine est appliquée. Enfin l'animal est placé dans la couveuse jusqu'à son réveil. La basse de la pompe est découpée avec un scalpel afin de s'assurer que tout le contenu de la pompe a bien été délivré.

II.E. Imagerie des tumeurs

Le rat est anesthésié, suite à la pose d'un cathéter dans une des veines de la queue 1 mL d'agent de contraste iodé (Ioméron) à 350 mg/ml en iode; tiédi à 37 °C (pour le rendre moins visqueux) suivi de 0,8 ml de sérum physiologique sont injectés. Puis l'animal est placé sur le cadre stéréotaxique en plexiglas. Le cadre est mis en position verticale une dizaine de minutes après l'injection d'Ioméron et fixé sur la chaise. Les images sont acquises à 35 keV afin de maximiser le contraste entre l'iode et les tissus sains, 15 coupes jointives de 1 mm de hauteur permettent généralement de couvrir l'ensemble du volume tumoral.

II.F. Microscopie électronique

Le cerveau est prélevé puis déposé sur une matrice qui permet de réaliser des coupes de 1 mm. Plusieurs tranches sont coupées et déposées sur du papier aluminium. Dans la coupe contenant la plus grande zone d'injection de l'or, des petits cubes d'environ 1 mm³ sont découpés puis plongés dans un fixateur.

Les échantillons sont fixés pendant 48 heures par immersion dans une solution de 2.5% glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate 0.1 M, pH 7.2. L'échantillon est ensuite lavé dans du tampon cacodylate avant d'être post-fixé sur la glace pendant 1 heure avec 1% d'osmium dilué dans du cacodylate 0.1M. Pour contraster les composants cellulaires, ils sont lavés à l'eau puis colorés en bloc pendant une nuit à 4°C avec de l'acétate d'uranyle 0.5 % dilué dans l'eau. Pour pouvoir inclure les échantillons dans de la résine qui est hydrophobe, ceux-ci sont d'abord déshydratés par des bains successifs d'éthanol de 30 % à 100%, puis imprégnés dans un bain de résine EPON 50%-Ethanol 50 % suivi de 2 bains d'EPON 100%. Les échantillons sont enfin inclus dans une capsule d'EPON pur qui est polymérisé pendant 72 h à 60°C.

L'échantillon inclus dans le bloc de résine polymérisée est ensuite coupé en section de 60 nm avec un ultramicrotome (Reichert Ultracut). Ces coupes sont réalisées à l'aide d'un diamant affûté qui est adossé à une mini cuve d'eau. Les coupes qui flottent à la surface de l'eau sont récupérées sur une grille de 3 mm de diamètre recouvertes d'un film de formvar et de carbone. Elles sont enfin colorées pendant 10 minutes avec de l'acétate d'uranyle à 5 %, lavées puis colorées pendant 5 min avec du citrate de plomb 0.4%.

Après séchage ces coupes sont observées au microscope électronique à transmission JEOL 1200EX à une tension de 80 kV. Les images sont acquises à l'aide d'une caméra numérique (Veleta, SIS, Olympus), nous modulons les paramètres de contraste afin de pouvoir localiser les particules d'or colloïdal.

III. Lésions de l'ADN

III.A. Synthèse des standards des adduits platinés

III.A.1 Adduit dGpdG-Pt

A 1 μ mole de dinucléotides GpG, 1,2 équivalent de cisplatine est ajouté dans un volume de 800 μ l. La solution est placée 2 jours dans une étuve à 37°C. L'avancement de la

réaction est suivi par HPLC. Un petit volume de la solution est analysé en HPLC. Puis le brut réactionnel est purifié par HPLC.

III.A.2 Adduit GpG-Pt

A 775 µg de trinuécléotides GpGdT, 5 équivalents de cisplatine sont ajoutés dans un volume de 625 µl. La solution est placée 2 jours dans une étuve à 37°C. L'avancement de la réaction est suivi par HPLC. Un petit volume de la solution est analysé en HPLC. Puis le brut réactionnel est purifié par HPLC.

III.B. Purification des adduits par HPLC

La séparation chromatographique des bruts de réaction des synthèses des adduits platinés est réalisée sur une colonne uptisphère ODB 5 µ, 250 x 4,6 mm (InterChim). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0 à 12 % d'acétonitrile pendant 30 min dans l'acétate de triéthylammonium 10 mM à un débit de 1 ml/min. La longueur d'onde de détection UV est de 260 nm. Le temps de rétention dans ces conditions de l'adduit dGpdG-Pt est d'environ 10,8 min et celui de l'adduit GppG-Pt de 5,3 min.

III.C. Extraction d'ADN et d'ARN

Les enzymes : ribonucléase T1 et ribonucléase A ainsi que les réactifs proviennent de chez Sigma et la protéase provient de chez Quiagen.

Lyse de la membrane plasmique : le culot cellulaire est décongelé, repris et homogénéiser par pipetage successifs avec 750 µl de tampon de lyse A (320 mM de sucrose, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris/HCl, 0,1 mM de déféroxamine et 1% de Triton X₁₀₀, pH 7,5). Ensuite l'échantillon est centrifugé 5 min à 1500 g. Cette étape est répétée une deuxième fois.

Lyse de la membrane nucléaire : le culot nucléaire est repris dans 600 µl de tampon de lyse B (5 mM d'EDTA-Na₂, 10 mM de Tris-HCl et 0,15 mM de déféroxamine, pH 8). Après homogénéisation, 35 µl de SDS (10%) sont ajoutés suivi de 3 µl de RNase A (100 mg/ml) et 7 µl de RNase T1 (1U/µl). Les échantillons sont ensuite incubés 15 min à 50°C, puis pendant 1 h à 37°C après addition de 30 µl de protéase (20 mg/ml).

Précipitation de l'ADN : L'ADN est précipité par addition de 1,2 mL de NaI (20 mM d'EDTA- Na_2 , 7,6 M de NaI, 40 mM de Tris/HCl et 0,3 mM de déféroxamine, pH 8) et 2 mL d'isopropanol (100%) et les échantillons sont agités doucement par retournement. Les échantillons sont centrifugés 5 min à 5000 g. Le surnageant est vidé et on reprend le culot d'ADN dans 1 mL d'isopropanol (40%) avant de centrifuger à nouveau à 5000 g pendant 5 min. 1 mL d'éthanol (70%) est ajouté au culot d'ADN, enfin à l'issue d'une dernière centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est solubilisé dans 50 μL de déféroxamine qui permet d'éviter l'oxydation et stocké à -20°C jusqu'à l'étape d'hydrolyse de l'ADN.

Pour extraire l'ARN du noyau, il ne faut pas mettre de RNAses après l'étape de la lyse de la membrane plasmique.

Pour extraire l'ARN cytoplasmique, après la première étape de lyse membranaire avec le tampon A, il faut garder le surnageant dans la glace, et reprendre la suite de l'extraction au moment où on ajoute la protéase, et ensuite procéder exactement comme pour l'ADN.

III.D. Digestion d'ADN (et ARN)

Toutes les enzymes utilisées proviennent de chez Sigma-Aldrich.

L'ADN est digéré de façon enzymatique, on ajoute à la solution d'ADN (50 μL) un mélange d'enzymes préparée comme suit : 0,25 μL de phosphodiesterase II (0,1 U/ μL), 0,25 μL de DNase II (10 U/ μL), 2,5 μL de nucléase P1, 5 μL d'inhibiteur EHNA (érythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adénine) et 2,5 μL de tampon (200 mM acide succinique, 100 mM CaCl_2 , pH 6) et on place les échantillons à 37°C pendant 2 h, en les agitant au bout de 30 min d'incubation. Ensuite on ajoute le mélange suivant d'enzymes : 6 μL de tampon de phosphatase alcaline (500 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), 0,5 μL de phosphodiesterase I et 2 unités de phosphatase alcaline et on laisse à nouveau incubé 2 h à 37°C . Enfin, on neutralise la solution en ajoutant 3,5 μL d'HCl (0,1 N), on centrifuge 5 min 5000 g et on transfère le surnageant dans un vial HPLC. Eventuellement les échantillons peuvent être lyophilisés et repris dans 50 μL d'eau désionisée. Les échantillons sont prêts à être analysés.

Pour l'ARN la digestion se fait de la même façon.

III.E. Analyse HPLC-MS/MS

Le système est composé d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance achetée chez (Thermo) couplée en ligne à un spectromètre de masse en mode tandem TSQ Quantum (Thermo). Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

III.E.1 IUdR

La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne uptisphère ODB 3 μ , 150 x 2,1 mm (InterChim). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0 à 20 % d'acétonitrile pendant 27 min dans du formiate d'ammonium 2 mM à un débit de 200 μ l/min. Le temps de rétention dans ces conditions de l'IUdR est d'environ xxmin.

III.E.2 Adduits platinés ADN/ARN

La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne uptisphère C18 5 μ . L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0 à 15 % d'acétonitrile pendant 20 min dans de l'acétate de triéthylammonium 2 mM à un débit de 200 μ l/min. Le temps de rétention dans ces conditions de l'adduit dGpdG-Pt est d'environ 10,8 min et celui de l'adduit GppG-Pt de 5,3 min.

Le spectromètre de masse est constitué d'une source électrospray couplé à un analyseur à triple quadripôles. Le mode MRM est utilisé avec une ionisation négative par électrospray. Les transitions sélectionnées sont les suivantes pour :

- **IudR**

Adduits	Transitions	Energie de collision
Adduit IUdR	352,8 \rightarrow 127	17
	352,8 \rightarrow 237	18
	352,8 \rightarrow 263	15

- **Adduits platinés ADN/ARN**

Adduits	Transitions	Energie de collision	Adduits	Transitions	Energie de collision
Adduit dGpdG-Pt	821 \rightarrow 804	15	Adduit GpG-Pt	853 \rightarrow 836	12
	822 \rightarrow 805			854 \rightarrow 837	
	823 \rightarrow 806			855 \rightarrow 838	

Des standards externes permettent de déterminer la quantité d'adduits injectés. Le détecteur UV permet la détection à 3 longueurs d'ondes (260, 280 et 300 nm) des nucléosides normaux. Ainsi la quantification des nucléosides normaux est possible pour une très large gamme de concentrations. En effet, une concentration trop importante induit une saturation du signal à 260 nm, mais l'absorption plus faible des nucléosides à 280 et 300 nm permet d'obtenir un signal mesurable. Enfin les résultats sont donnés sous la forme d'un ratio entre la quantité d'adduits et la quantité de nucléosides normaux.

Références bibliographiques

- Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease* **37**: 13-25.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **7**: 41-53.
- Adam JF, Biston MC, Joubert A, Charvet AM, Le Bas JF, Esteve F *et al* (2005). Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **61**: 1173-82.
- Adams FH, Norman A, Mello RS, Bass D (1977). Effect of radiation and contrast media on chromosomes. Preliminary report. *Radiology* **124**: 823-6.
- Aida T, Bodell WJ (1987). Cellular resistance to chloroethylnitrosoureas, nitrogen mustard, and cis-diamminedichloroplatinum(II) in human glial-derived cell lines. *Cancer Res* **47**: 1361-6.
- Allen NJ, Barres BA (2009). NEUROSCIENCE Glia - more than just brain glue. *Nature* **457**: 675-677.
- Arifin DY, Lee KY, Wang CH, Smith KA (2009). Role of convective flow in carmustine delivery to a brain tumor. *Pharm Res* **26**: 2289-302.
- Barth RF (1998). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *Journal of neuro-oncology* **36**: 91-102.
- Barth RF (2009). Boron neutron capture therapy at the crossroads: challenges and opportunities. *Appl Radiat Isot* **67**: S3-6.
- Barth RF, Kaur B (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* **94**: 299-312.
- Bellavance MA, Blanchette M, Fortin D (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *AAPS J* **10**: 166-77.
- Berry SE, Loh T, Yan T, Kinsella TJ (2003). Role of MutSalpha in the recognition of iododeoxyuridine in DNA. *Cancer Res* **63**: 5490-5.
- Bhattacharya R, Mukherjee P (2008). Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* **60**: 1289-306.
- Biston MC (2004). Radio-chimiothérapie par photoactivation synchrotron de drogues platinées anticancéreuses.

- Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM *et al* (2004). Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* **64**: 2317-23.
- Bodell WJ, Tokuda K, Ludlum DB (1988). Differences in DNA alkylation products formed in sensitive and resistant human glioma cells treated with N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* **48**: 4489-92.
- Boisselier E, Astruc D (2009). Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev* **38**: 1759-82.
- Boudou C, Balosso J, Esteve F, Elleaume H (2005). Monte Carlo dosimetry for synchrotron stereotactic radiotherapy of brain tumours. *Phys Med Biol* **50**: 4841-51.
- Bredel M (2001). Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev* **35**: 161-204.
- Bredel M, Zentner J (2002). Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. *Lancet Oncol* **3**: 397-406.
- Brown SD, Nativo P, Smith JA, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B *et al* (2010). Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 4678-4684.
- Brun E, Sanche L, Sicard-Roselli C (2009). Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids Surf B Biointerfaces* **72**: 128-34.
- Butterworth KT, Coulter JA, Jain S, Forker J, McMahon SJ, Schettino G *et al* (2010). Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology* **21**: 295101.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL (1997). Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **131**: 1-87.
- Cadet J, Douki T, Frelon S, Sauvaigo S, Pouget JP, Ravanat JL (2002). Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radic Biol Med* **33**: 441-9.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* **531**: 5-23.
- Carpentier AC (2008). Surgical resection of gliomas in 2008. *Cancer Radiotherapie* **12**: 676-686.
- Cecchini S, Girouard S, Huels MA, Sanche L, Hunting DJ (2005). Interstrand cross-links: a new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry* **44**: 1932-40.

- Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL (2008). Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci* **99**: 1479-84.
- Chatel MF, M.; Lebrun, C.; Fauchon, F. (2005). High grade gliomas: anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *EMC-Neurologie* **2**: 257-278.
- Chithrani BD, Stewart J, Allen C, Jaffray DA (2009). Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. *Nanomedicine* **5**: 118-27.
- Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, van Prooijen M, Allen C, Bristow RG *et al* (2010). Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res* **173**: 719-28.
- Cho SH (2005a). Estimation of tumor dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: A preliminary Monte Carlo study. *Medical Physics* **32**: 2162-2162.
- Cho SH (2005b). Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys Med Biol* **50**: N163-73.
- Clendenon NR, Barth RF, Gordon WA, Goodman JH, Alam F, Staubus AE *et al* (1990). Boron neutron capture therapy of a rat glioma. *Neurosurgery* **26**: 47-55.
- Cook JA, Glass J, Lebovics R, Bobo H, Pass H, DeLaney TF *et al* (1992). Measurement of thymidine replacement in patients with high grade gliomas, head and neck tumors, and high grade sarcomas after continuous intravenous infusions of 5-iododeoxyuridine. *Cancer Res* **52**: 719-25.
- Corde S, Joubert A, Adam JF, Charvet AM, Le Bas JF, Esteve F *et al* (2004). Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds. *Br J Cancer* **91**: 544-51.
- Dawson P, Penhaligon M, Smith E, Saunders J (1988). Synergistic cytotoxicity of iodinated contrast agents and x-radiation. *Invest Radiol* **23 Suppl 1**: S110-3.
- De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials* **29**: 1912-9.
- Degen JW, Walbridge S, Vortmeyer AO, Oldfield EH, Lonser RR (2003). Safety and efficacy of convection-enhanced delivery of gemcitabine or carboplatin in a malignant glioma model in rats. *J Neurosurg* **99**: 893-8.
- den Hartog JH, Altona C, Chottard JC, Girault JP, Lallemand JY, de Leeuw FA *et al* (1982). Conformational analysis of the adduct cis-[Pt(NH₃)₂ d(GpG)]⁺ in aqueous solution. A high field (500-300 MHz) nuclear magnetic resonance investigation. *Nucleic Acids Res* **10**: 4715-30.

- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MFG, Tsang LLH, Slack JA (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **33**: 9045-9051.
- Doblas S, He T, Saunders D, Pearson J, Hoyle J, Smith N *et al* (2010). Glioma morphology and tumor-induced vascular alterations revealed in seven rodent glioma models by in vivo magnetic resonance imaging and angiography. *J Magn Reson Imaging* **32**: 267-75.
- Doetsch F (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* **6**: 1127-34.
- Doiron A, Yapp DT, Olivares M, Zhu JX, Lehnert S (1999). Tumor radiosensitization by sustained intratumoral release of bromodeoxyuridine. *Cancer Res* **59**: 3677-81.
- Dolan ME, Pegg AE (1997). O6-benzylguanine and its role in chemotherapy. *Clin Cancer Res* **3**: 837-47.
- Ducray F (2008). Biology of gliomas. *Cancer Radiotherapie* **12**: 663-668.
- Dugas J, Varnes M, Sajo E, Welch CE, Ham K, Hogstrom KR (2010). Dependence of Cell Survival on IUdR Concentration in 35 keV Photon-activated Auger Electron Radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.
- Eccles LJ, Lomax ME, O'Neill P (2010). Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered DNA damage. *Nucleic Acids Res* **38**: 1123-34.
- Edouard M (2010). Dosimétrie par radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron : d'une vision macroscopique à des considérations microscopiques des dépôts d'énergie.
- Edouard M, Broggio D, Prezado Y, Esteve F, Elleaume H, Adam JF (2010). Treatment plans optimization for contrast-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy. *Med Phys* **37**: 2445-56.
- Elleaume H, Charvet AM, Berkvens P, Berruyer G, Brochard T, Dabin Y *et al* (1999). Instrumentation of the ESRF medical imaging facility. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **428**: 513-527.
- Esteller M (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents (vol 343, pg 1350, 2000). *New England Journal of Medicine* **343**: 1740-1740.
- Fornace AJ, Jr., Dobson PP, Kinsella TJ (1990). Enhancement of radiation damage in cellular DNA following unifilar substitution with iododeoxyuridine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **18**: 873-8.
- Fournier E, Passirani C, Montero-Menei C, Colin N, Breton P, Sagodira S *et al* (2003). Therapeutic effectiveness of novel 5-fluorouracil-loaded poly(methylidene malonate 2.1.2)-based microspheres on F98 glioma-bearing rats. *Cancer* **97**: 2822-9.

- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* **1**: 2315-9.
- Friedberg E C. WG, Siede W., Wood R., Schultz R., Ellenberg T. (2005). DNA Repair and Mutagenesis, Second Edition.
- Friedman HS, Kerby T, Calvert H (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research* **6**: 2585-2597.
- Georgakilas AG (2008). Processing of DNA damage clusters in human cells: current status of knowledge. *Mol Biosyst* **4**: 30-5.
- Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA (2010). Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**: 3280-94.
- Guarnieri M, Carson BS, Khan A, Penno M, Jallo GI (2005). Flexible versus rigid catheters for chronic administration of exogenous agents into central nervous system tissues. *J Neurosci Methods* **144**: 147-52.
- Guliaev AB, Singer B, Hang B (2004). Chloroethylnitrosourea-derived ethano cytosine and adenine adducts are substrates for Escherichia coli glycosylases excising analogous etheno adducts. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1311-21.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM (2008). Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *J Pharm Pharmacol* **60**: 977-85.
- Hainfeld JF, Slatkin DN, Focella TM, Smilowitz HM (2006). Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br J Radiol* **79**: 248-53.
- Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM (2004). The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* **49**: N309-15.
- Hall AG, Tilby MJ (1992). Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Rev* **6**: 163-73.
- Harrington KJ, Syrigos KN, Uster PS, Zetter A, Lewanski CR, Gullick WJ *et al* (2004). Targeted radiosensitisation by pegylated liposome-encapsulated 3', 5'-O-dipalmitoyl 5-iodo-2'-deoxyuridine in a head and neck cancer xenograft model. *Br J Cancer* **91**: 366-73.
- Hartinger CG, Tsybin YO, Fuchser J, Dyson PJ (2008). Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites using a top-down mass spectrometric approach. *Inorg Chem* **47**: 17-9.
- Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, de Tribolet N, Weller M *et al* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**: 997-1003.
- Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-74.

- Ide H, Kotera M (2004). Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull* **27**: 480-5.
- Iijima H, Patrzyc HB, Dawidzik JB, Budzinski EE, Cheng HC, Freund HG *et al* (2004). Measurement of DNA adducts in cells exposed to cisplatin. *Anal Biochem* **333**: 65-71.
- Ikushima H (2010). Radiation therapy: state of the art and the future. *J Med Invest* **57**: 1-11.
- Iwamoto KS, Cochran ST, Winter J, Holburt E, Higashida RT, Norman A (1987). Radiation dose enhancement therapy with iodine in rabbit VX-2 brain tumors. *Radiother Oncol* **8**: 161-70.
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* **11**: 812-8.
- Jahnen-Dechent W, Simon U (2008). Function follows form: shape complementarity and nanoparticle toxicity. *Nanomedicine (Lond)* **3**: 601-3.
- Jennette KW, Lippard SJ, Vassiliades GA, Bauer WR (1974). Metallointercalation reagents. 2-hydroxyethanethiolato(2,2',2'-terpyridine)-platinum(II) monocation binds strongly to DNA by intercalation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 3839-43.
- Jiricny J (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 335-46.
- Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* **40**: 328-46.
- Jung Y, Lippard SJ (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* **107**: 1387-407.
- Kaneko S, Clendenon NR, Kartha M (1983). [Experimental study in a rat brain tumor by combined treatment with cis-DDP and irradiation]. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **23**: 917-23.
- Karnas SJ, Moiseenko VV, Yu E, Truong P, Battista JJ (2001). Monte Carlo simulations and measurement of DNA damage from x-ray-triggered auger cascades in iododeoxyuridine (IUdR). *Radiat Environ Biophys* **40**: 199-206.
- Karnas SJ, Yu E, McGarry RC, Battista JJ (1999). Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources. *Phys Med Biol* **44**: 2537-49.
- Kassis AI, Wen PY, Van den Abbeele AD, Baranowska-Kortylewicz J, Makrigiorgos GM, Metz KR *et al* (1998). 5-[¹²⁵I]iodo-2'-deoxyuridine in the radiotherapy of brain tumors in rats. *J Nucl Med* **39**: 1148-54.
- Kawabata S, Miyatake S, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Iida K, Miyata S *et al* (2009). Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. *Appl Radiat Isot* **67**: S15-8.

- Kelland L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**: 573-84.
- Khuntia D, Tome WA, Mehta MP (2009). Radiation Techniques in Neuro-Oncology. *Neurotherapeutics* **6**: 487-499.
- Kinsella TJ (2009). Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res* **15**: 1853-9.
- Klyachko DV, Huels MA, Sanche L (1999). Halogen anion formation in 5-halouracil films: X rays compared to subionization electrons. *Radiat Res* **151**: 177-87.
- Ko L, Koestner A, Wechsler W (1980). Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol* **51**: 23-31.
- Kong T, Zeng J, Wang X, Yang X, Yang J, McQuarrie S *et al* (2008). Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles. *Small* **4**: 1537-43.
- Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology* **64**: 259-273.
- Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, Milosevic M, Wong S, Glen J *et al* (1998). Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **41**: 1005-11.
- Laster BH, Thomlinson WC, Fairchild RG (1993). Photon activation of iododeoxyuridine: biological efficacy of Auger electrons. *Radiat Res* **133**: 219-24.
- Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J, Stetson PL, Ensminger WD (1990). The dependence of halogenated pyrimidine incorporation and radiosensitization on the duration of drug exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **18**: 1393-8.
- Liu CJ, Wang CH, Chen ST, Chen HH, Leng WH, Chien CC *et al* (2010). Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol* **55**: 931-45.
- Ludlum DB (1997). The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest* **15**: 588-98.
- McDonald JM, See SJ, Tremont IW, Colman H, Gilbert MR, Groves M *et al* (2005). The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. *Cancer* **104**: 1468-1477.
- Menei P, Metellus P, Parot-Schinkel E, Loiseau H, Capelle L, Jacquet G *et al* (2010). Biodegradable Carmustine Wafers (Gliadel) Alone or in Combination with Chemoradiotherapy: The French Experience. *Annals of Surgical Oncology* **17**: 1740-1746.

- Mesa AV, Norman A, Solberg TD, Demarco JJ, Smathers JB (1999). Dose distributions using kilovoltage x-rays and dose enhancement from iodine contrast agents. *Phys Med Biol* **44**: 1955-68.
- Middleton MR, Margison GP (2003). Improvement of chemotherapy efficacy by inactivation of a DNA-repair pathway. *Lancet Oncol* **4**: 37-44.
- Nakagawa Y, Kageji T, Mizobuchi Y, Kumada H (2009). Clinical results of BNCT for malignant brain tumors in children. *Appl Radiat Isot* **67**: S27-30.
- Nath R, Bongiorno P, Rockwell S (1987). Enhancement of IUdR radiosensitization by low energy photons. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **13**: 1071-9.
- Noll DM, Mason TM, Miller PS (2006). Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem Rev* **106**: 277-301.
- Norman A, Adams FH, Riley RF (1978). Cytogenetic effects of contrast media and triiodobenzoic acid derivatives in human lymphocytes. *Radiology* **129**: 199-203.
- Norman A, Ingram M, Skillen RG, Freshwater DB, Iwamoto KS, Solberg T (1997). X-ray phototherapy for canine brain masses. *Radiat Oncol Investig* **5**: 8-14.
- Ohgaki H, Kleihues P (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* **100**: 2235-41.
- Olivero OA, Chang PK, Lopez-Larraz DM, Semino-Mora MC, Poirier MC (1997). Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat Res* **391**: 79-86.
- Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U *et al* (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* **3**: 1941-9.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P *et al* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**: 1807-12.
- Perry J, Chambers A, Spithoff K, Laperriere N (2007). Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol* **14**: 189-94.
- Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Muller R, Uhl R *et al* (2007). Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *J Control Release* **117**: 51-8.
- Pressacco J, Hedley DW, Erlichman C (1994). ICI D1694 and idoxuridine: a synergistic antitumor combination. *Cancer Res* **54**: 3772-8.
- Rabik CA, Dolan ME (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33**: 9-23.

- Raghavan R, Brady ML, Rodriguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C, Sampson JH (2006). Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus* **20**: E12.
- Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C *et al* (2009). Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **5**: 136-142.
- Rapoport SI (2000). Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* **20**: 217-30.
- Recinos VR, Tyler BM, Bekelis K, Sunshine SB, Vellimana A, Li KW *et al* (2010). Combination of intracranial temozolomide with intracranial carmustine improves survival when compared with either treatment alone in a rodent glioma model. *Neurosurgery* **66**: 530-7; discussion 537.
- Reithmeier T, Graf E, Piroth T, Trippel M, Pinsker MO, Nikkhah G (2010). BCNU for recurrent glioblastoma multiforme: efficacy, toxicity and prognostic factors. *BMC Cancer* **10**: 30.
- Rodriguez R, Ritter MA, Fowler JF, Kinsella TJ (1994). Kinetics of cell labeling and thymidine replacement after continuous infusion of halogenated pyrimidines in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **29**: 105-13.
- Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, Mesa A (1999). First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**: 1127-32.
- Rothenberg ML (1997). Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol* **8**: 837-55.
- Rousseau J (2007). Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales : intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques. *thèse*.
- Rousseau J, Adam JF, Deman P, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Gouget B *et al* (2009a). Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma. *J Synchrotron Radiat* **16**: 573-81.
- Rousseau J, Barth RF, Fernandez M, Adam JF, Balosso J, Esteve F *et al* (2010). Efficacy of intracerebral delivery of cisplatin in combination with photon irradiation for treatment of brain tumors. *J Neurooncol* **98**: 287-95.
- Rousseau J, Barth RF, Moeschberger ML, Elleaume H (2009b). Efficacy of intracerebral delivery of Carboplatin in combination with photon irradiation for treatment of F98 glioma-bearing rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**: 530-6.
- Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Esteve F, Elleaume H (2007a). Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. *Clin Cancer Res* **13**: 5195-201.

- Rousseau J, Boudou C, Esteve F, Elleaume H (2007b). Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**: 943-51.
- Safaei R (2006). Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* **234**: 34-9.
- Samnick S, Romeike BF, Lehmann T, Israel I, Rube C, Mautes A *et al* (2009). Efficacy of systemic radionuclide therapy with p-131I-iodo-L-phenylalanine combined with external beam photon irradiation in treating malignant gliomas. *J Nucl Med* **50**: 2025-32.
- Sanai N, Berger MS (2009). Operative Techniques for Gliomas and the Value of Extent of Resection. *Neurotherapeutics* **6**: 478-486.
- Santos Mello R, Callisen H, Winter J, Kagan AR, Norman A (1983). Radiation dose enhancement in tumors with iodine. *Med Phys* **10**: 75-8.
- Sarkaria JN, Kitange GJ, James CD, Plummer R, Calvert H, Weller M *et al* (2008). Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clin Cancer Res* **14**: 2900-8.
- Scharer OD (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 2946-74.
- Seibert JA, Boone JM (2005). X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation. *J Nucl Med Technol* **33**: 3-18.
- Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, Takenaka S *et al* (2008). Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small* **4**: 2108-11.
- Shinohara K, Nakano H, Ohara H (1996). Detection of Auger enhancement induced in HeLa cells labeled with iododeoxyuridine and irradiated with 150 kV x-rays--Effects of cysteamine and dimethylsulfoxide. *Acta Oncol* **35**: 869-75.
- Sneed PK, Lamborn KR, Larson DA, Prados MD, Malec MK, McDermott MW *et al* (1996). Demonstration of brachytherapy boost dose-response relationships in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **35**: 37-44.
- Solberg TD, Iwamoto KS, Norman A (1992). Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours. *Phys Med Biol* **37**: 439-43.
- Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008). Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces* **66**: 274-80.
- Song DK, Lonser RR (2008). Convection-enhanced delivery for the treatment of pediatric neurologic disorders. *J Child Neurol* **23**: 1231-7.

- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Hans-Jurgen R (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncology* **7**: 392-401.
- Stupp R (2007). Un guide pratique au traitement des gliomes. *Bulletin du Cancer* **94**: 817-822.
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC *et al* (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncology* **10**: 459-466.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB *et al* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine* **352**: 987-996.
- Swenberg JA, Koestner A, Wechsler W, Denlinger RH (1972). Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats. *Cancer Res* **32**: 2656-60.
- Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G *et al* (2003). Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Res* **63**: 838-46.
- Tong WP, Kirk MC, Ludlum DB (1982). Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res* **42**: 3102-5.
- Tubiana M (2008). Radiobiologie Radiothérapie et radioprotection Bases fondamentales. *Hermann Editeurs*.
- Turner DP, Cortellino S, Schupp JE, Caretti E, Loh T, Kinsella TJ *et al* (2006). The DNA N-glycosylase MED1 exhibits preference for halogenated pyrimidines and is involved in the cytotoxicity of 5-iododeoxyuridine. *Cancer Res* **66**: 7686-93.
- Usami N, Furusawa Y, Kobayashi K, Lacombe S, Reynaud-Angelin A, Sage E *et al* (2008). Mammalian cells loaded with platinum-containing molecules are sensitized to fast atomic ions. *Int J Radiat Biol* **84**: 603-11.
- Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, Frohlich H, Lacombe S, Sech CL (2007). Irradiation of DNA loaded with platinum containing molecules by fast atomic ions C(6+) and Fe(26+). *Int J Radiat Biol* **83**: 569-76.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ (2010). Exciting New Advances in Neuro-Oncology The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians* **60**: 166-193.
- Voges J, Reszka R, Gossmann A, Dittmar C, Richter R, Garlip G *et al* (2003). Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. *Ann Neurol* **54**: 479-87.

- Wang DD, Bordey A (2008). The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* **86**: 342-67.
- Wen PY, Kesari S (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* **359**: 492-507.
- Williams JA, Yuan X, Dillehay LE, Shastri VR, Brem H, Williams JR (1998). Synthetic, implantable polymers for local delivery of IUdR to experimental human malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**: 631-9.
- Wu Q, Guarnieri M, Tyler B, Clatterbuck RE, Liu Y, Carson BS (2004). Section on tumors: Young Investigator Award: Local release of carboplatin via an Alzet mini-osmotic pump prolongs survival in a rat brainstem tumor model. *Clin Neurosurg* **51**: 332-9.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W *et al* (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**: 765-73.
- Yang W, Barth RF, Rotaru JH, Moeschberger ML, Joel DD, Nawrocky MM *et al* (1997). Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenylalanine. *J Neurooncol* **33**: 59-70.
- Yang W, Barth RF, Wu G, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, Moffat BA *et al* (2005). Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res* **11**: 341-50.
- Yang W, Huo T, Barth RF, Gupta N, Weldon M, Grecula JC *et al* (2010). Convection enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors. *J Neurooncol*.

Tables des matières

ABREVIATIONS.....	1
AVANT PROPOS.....	3
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. Gliome	5
I.A. Cellules gliales.....	5
I.B. Gliomes.....	7
II. Barrière Hémato-Encéphalique et injection intracérébrale	10
II.A. Barrière Hémato-Encéphalique	10
II.B. Injection intracérébrale	12
III. Traitement des gliomes de haut grade.....	15
III.A. Neurochirurgie des tumeurs cérébrales : développements récents.....	16
III.B. Radiothérapie : progrès récents	18
III.C. Chimiothérapie	20
IV. Dommages de l'ADN	22
IV.A. ADN et rayonnement ionisant	24
IV.B. ADN et agents de chimiothérapie	28
IV.C. Systèmes de réparation	35
IV.D. Résistance aux agents de chimiothérapie	38
IV.E. Marqueurs moléculaires de la réponse à la thérapie proposée	43
V. Notions sur les rayonnements ionisants	45
V.A. Rayonnements ionisants, définitions et natures	45
V.B. Interactions photons-matière.....	46
VI. Radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron (SSRT).....	48
VI.A. Premices de la photoactivation	48
VI.B. Potentiel de la photoactivation pour la thérapie anticancéreuse	49
VI.C. Premier essai clinique	52
OBJECTIFS	53
TECHNIQUES EXPERIMENTALES.....	55
I. Techniques d'irradiation et d'imagerie	55
I.A. Installation et Rayonnement synchrotron	55
I.B. Irradiation et imagerie monochromatique stéréotaxique	57
I.C. Autres sources d'irradiation et d'imagerie	61

II. Evaluation de l'effet du rayonnement en présence ou non d'atomes lourds.....	64
II.A. Etudes précliniques.....	64
II.B. Survie cellulaire.....	65
II.C. Etudes des dommages de l'ADN.....	66
II.D. Quantification des dommages de l'ADN (HPLC-MS/MS).....	67

CHAPITRE 1 ASSOCIATION D'AGENTS DE CHIMIOOTHERAPIE PLATINES ET DE RADIOTHERAPIE.....71

I. Chimio-radiothérapie des gliomes par le carboplatine	72
I.A. Contexte de l'étude	72
I.B. Modèle tumoral	74
I.C. Résultats	75
II. Quantification des adduits platinés de l'ADN et de l'ARN	77
II.A. Synthèse des adduits platinés	78
II.B. Méthode de quantification.....	78
II.C. Cinétique de formation des adduits	80
III. Chlorure de chlorotertpyridineplatine, PtTC	83
III.A. Contexte de l'étude	83
III.B. Etude de survie cellulaire.....	84
III.C. Etude de la toxicité du PtTC sur rats sains.....	85
III.D. Evaluation de l'efficacité du traitement.....	86

CHAPITRE 2 AUGMENTATION DE DOSE PAR UNE IRRADIATION SYNCHROTRON EN PRESENCE D'AGENTS IODES.....89

I. Contexte de l'étude.....	89
II. 5-iodo-2'-désoxyuridine, IUdR	90
II.A. Incorporation de l'IUdR dans l'ADN	92
II.B. Cytotoxicité de l'IUdR.....	95
III. IUdR et rayonnement.....	98
III.A. Recherche de l'énergie optimale	98
III.B. Etude de survie cellulaire.....	101
III.C. Cassures des brins de l'ADN.....	108
IV. Ioméron, agent de contraste	114
IV.A. Etude de survie cellulaire	114
IV.B. Cassures des brins de l'ADN	116
V. Association de l'IUdR et de l'ioméron	120
VI. Conclusion.....	121

CHAPITRE 3 PHOTOACTIVATION DE NANOPARTICULES D'OR DANS LE CADRE DE LA SSRT 127

I. Contexte de l'étude	127
I.A. Applications thérapeutiques	127
I.B. Photoactivation des NPo	128
II. Photoactivation des NPo <i>in vitro</i>	134
II.A. Energie optimale.....	134
II.B. NPo de 1,9 nm.....	136
II.C. NPo de 15 nm.....	139
II.D. Comparaison des NPo de 1,9 nm et 15 nm	142
II.E. Conclusion et discussion	142
III. Photoactivation des NPo <i>in vivo</i>	143
III.A. Connaissances actuelles de la biodistribution.....	144
III.B. Toxicité des NPo <i>in vivo</i>	145
III.C. Imagerie par tomographie X.....	147
III.D. Evaluation du renforcement de la dose par les NPo en thérapie des gliomes	157
III.E. Microscopie électronique	164
IV. Conclusion	168
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	171
MATERIELS ET METHODES	177
I. Etudes cellulaires	177
I.A. Repiquage des cellules	177
I.B. Congélation des cellules.....	178
I.C. Irradiation des cellules.....	178
I.D. Test de clonogénicité	178
I.E. Test des comètes	179
II. Etudes sur les animaux	180
II.A. Préparation des cellules pour implantation (1 000 cellules dans 4 µl)	180
II.B. Implantation des cellules dans le cerveau du rat	182
II.C. Injection intracérébrale en CED	183
II.D. Pompes osmotiques	183
II.E. Imagerie des tumeurs.....	185
II.F. Microscopie électronique	186
III. Lésions de l'ADN	186
III.A. Synthèse des standards des adduits platinés	186
III.B. Purification des adduits par HPLC	187
III.C. Extraction d'ADN et d'ARN.....	187
III.D. Digestion d'ADN (et ARN).....	188
III.E. Analyse HPLC-MS/MS	188

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	191
TABLES DES MATIERES.....	203

Renforcement de la dose par rayonnement synchrotron et atomes lourds dans le cadre du traitement des gliomes

Les gliomes de haut grade sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. Le traitement standard proposé combine la chirurgie, la radiothérapie et parfois l'utilisation de témozolomide (agent de chimiothérapie). Une limitation majeure de la radiothérapie provient de la radiosensibilité des tissus sains. La radiothérapie stéréotaxique par rayonnement synchrotron est une technique innovatrice dont le principe est de combiner un rayonnement basse énergie (inférieur à 100 keV) à la présence d'atomes lourds dans la zone tumorale afin d'augmenter la dose déposée et ainsi accroître le différentiel de dépôt de dose entre la tumeur et les tissus sains environnants.

Dans cette étude, plusieurs composés contenant des atomes lourds tels que les agents de chimiothérapie : cisplatine/carboplatine, un analogue d'une base de l'ADN : la 5-iodo-2'-désoxyuridine (IUdR) ou bien des nanoparticules d'or ont été considérés. Des études cellulaires ont permis de quantifier les facteurs d'augmentation de dose induits par la présence de ces composés dans l'environnement extracellulaire pour certains et intracellulaire pour d'autres. Lors d'études *in vivo* effectuées sur des rats porteurs de gliomes, la toxicité, cinétique de distribution et la localisation de ces composés a été déterminée, ainsi que l'efficacité potentielle du traitement associant injection cérébrale et irradiation basse énergie.

Dose enhancement by synchrotron radiation and heavy atoms for the treatment of gliomas

High grade gliomas are brain tumors of bad prognosis. The standard therapeutic treatment combines surgery, radiotherapy and sometimes use of temozolomide (chemotherapy agent). Healthy tissues radiosensitivity is a major limitation for radiotherapy treatment. The stereotactic radiotherapy by synchrotron radiation is an innovative technique which combines a low energy radiation (lower 100 keV) with the presence of heavy atoms in the tumoral zone. Such an approach is used to increase the differential of dose deposited in the tumor compared to surrounding healthy tissues.

In this study, several compounds containing heavy atoms such as chemotherapy agents: cisplatin/carboplatin, a DNA base analog: 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) and gold nanoparticles were considered. The dose enhancement factor induced by the presence of these compounds located for some of them in the extracellular medium or inside the cells for others, was determined using *in vitro* studies. Thereafter, *in vivo* studies on rats bearing gliomas, were performed to study the toxicity, the kinetic of distribution and the localization of these compounds together with their potential efficacy of treatment combining intracerebral injection with low energy radiation.